



FOLIO DE
 BASES

128

CÓDIGO
 (uso interno)

BIOT- 01- A - 65

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

Generación de un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico obtenidos de plantas nativas, utilizables en programas de mejoramiento genético vía transgenosis de variedades cultivables

Línea Temática: **Agricultura y Ganadería**

Rubro: **Biología Vegetal**

Región(es) de Ejecución: **Séptima**

Fecha de Inicio: **1/11/2001**

DURACIÓN: **46** meses

Fecha de Término: **31/08/2005**

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología.
 Universidad de Talca

Dirección : 2 Norte # 685

Ciudad y Región: Talca, Séptima

RUT :

Teléfono : 71.200268

Fax y e-mail: 71-200276

Cuenta Bancaria (tipo, Nº, banco):

AGENTES ASOCIADOS: BIOPLANET- Servicios Integrales en Biotecnología LTDA.

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: Alvaro Rojas Marín

Cargo en el agente postulante: Rector

RUT:

Firma:

Dirección: 2 Norte # 686

Ciudad y Región: Talca, Séptima

Fono: 71-200101

Fax y e-mail:

COSTO TOTAL DEL PROYECTO
 (Valores Reajustados) : \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO
 (Valores Reajustados) : \$

48,64 %

APORTE DE CONTRAPARTE
 (Valores Reajustados) : \$

51.36





2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

2.1. Equipo de coordinación del proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO

NOMBRE	RUT	FIRMA
SIMÓN RUIZ LARA		
AGENTE	DEDICACIÓN PROYECTO (%/año)	
	27.27	
CARGO ACTUAL	CASILLA	
Académico Jornada Completa del Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología de la Universidad de Talca.	785	
DIRECCIÓN	CIUDAD	
2 Norte 685	Talca	
FONO	FAX	E-MAIL
071-200268	071-200276	sruiz@pehuenche. utal.cl

COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

NOMBRE	RUT	FIRMA
ENRIQUE GONZALEZ VILLANUEVA		
AGENTE	DEDICACIÓN PROYECTO %/AÑO	
	22.73	
CARGO ACTUAL	CASILLA	
Académico Jornada Completa del Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología de la Universidad de Talca.	785	
DIRECCIÓN	CIUDAD	
2 Norte 685	Talca	
FONO	FAX	EMAIL
071-200282	071-200276	egonzale@pehue nche. utal.cl





2.2 . Equipo Técnico del Proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
SIMÓN RUIZ LARA		Dr. en Biología Molecular	Biólogo Molecular	Coordinador General	27.27
ENRIQUE GONZALEZ		Dr. Ciencias Biológicas	Biólogo Molecular	Coordinador Alterno	22.73
ISABEL VERDUGO		Licenciada en Biología	Biología Vegetal	Asesor Técnico	34.09
FERNANDO POBLETE		Master en Bioquímica	Bioquímico	Asesor Técnico	22.73
CRISTINA THEODULOZ		Licenciada en Biología	Biología Vegetal	Asesor Técnico	22.73
MONICA YAÑEZ		Licenciada en Biología	Biotecnología Vegetal	Asesor Técnico	100.00





3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

(Completar esta sección al finalizar la formulación del Proyecto)

El desarrollo e incorporación tanto de nuevas tecnologías productivas como de variedades de cultivares, que posibiliten lograr, entre otros efectos, mayor eficiencia y rendimiento de los cultivos, mejor adaptabilidad a las condiciones de cultivo y mayor resistencia a las amenazas fitosanitarias, aparece como un imperativo para mantener la competitividad del sector agrícola nacional.

En este contexto, uno de los aspectos más importantes a considerar, es el impacto que factores medioambientales de naturaleza abiótica, tales como estrés hídrico, estrés salino y exposición a temperaturas bajas, ejercen sobre cultivos de alto valor comercial, afectando su producción y limitando las áreas geográficas para su explotación. El desarrollo de variedades tolerantes a tales condiciones medioambientales aparece como la alternativa estratégica de mayor viabilidad para minimizar el impacto de tales factores.

El mejoramiento genético molecular vía transgénesis constituye una metodología altamente adecuada para la generación de cultivares tolerantes a factores de estrés abiótico. Para su aplicación, no obstante, se requiere previamente de disponer de los factores genéticos involucrados en la adaptación a las condiciones de estrés referidas. La planta nativa *Lycopersicon chilense*, corresponde a una especie altamente adaptada a condiciones medioambientales extremas tales como: altas y bajas temperaturas, baja disponibilidad de agua y suelos de alta salinidad. En consideración a ello, se propone como objetivo central de este proyecto la identificación y aislamiento de los genes responsables de la adaptación a los factores mencionados exhibida por esta planta, a fin de disponer de un banco genético susceptible de ser utilizado en futuros programas de mejoramiento molecular de otras especies vegetales de valor agronómico.

Metodológicamente, la etapa clave para el éxito del proyecto corresponde a la identificación de los genes expresados en forma diferencial en plantas sometidas a las diferentes condiciones de estrés a analizar. Para ello se construirán genotecas de expresión sustraídas, las que contendrán solamente los genes cuya expresión es inducida en respuesta a la condición analizada. Se utilizará la técnica de hibridación por supresión substractiva (SSH) mediante el Kit PCR-Select de Clontech. Esta técnica ha aumentado la eficiencia de detección de transcritos diferenciales y ha reducido notablemente el "background" de falsos positivos que exhiben otras metodologías. Del mismo modo, y para validar su potencial utilización en mejoramiento genético vía transgénesis, se aislarán los genes correspondientes y su expresión diferencial será analizada mediante su transferencia a dos sistemas modelo de plantas transgénicas: *Arabidopsis thaliana* y *Lycopersicon esculentum*. Aquellos genes que retengan las propiedades de expresión determinadas en su hospedero natural *L. chilense*, serán incluidos en el banco de genes propuesto.





4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

Actualmente es posible la transformación genética de muchas especies de plantas de importancia en la agricultura. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología se ve limitada por la escasez de genes relevantes disponibles para iniciar programas de mejoramiento genético vía transgenosis. En Chile esta situación es de particular gravedad, debido a que no existen programas financiados a largo plazo, destinados a realizar una búsqueda exhaustiva de genes en especies nativas, que posibiliten su utilización en programas de mejoramiento genético. La mantención de la actual situación en la biotecnología vegetal nacional, implicará una dependencia tecnológica y económica cada vez mayor de los países más desarrollados y también, de aquellos que teniendo un nivel de desarrollo similar al nuestro, han iniciado programas de investigación y desarrollo tendientes a enfrentar las crecientes demandas competitivas a las que se verá sometida la agricultura en el próximo decenio.

De lo anterior se desprende la urgencia de incorporar valor agregado a los productos de la agricultura nacional y/o de reducir los costos de su producción. Una poderosa herramienta para ello es la biotecnología vegetal, para lo cual es imprescindible el que podamos contar con genes propios que pudiesen ser utilizados en programas de mejoramiento genético vía transgenosis.

Un grupo interesante de genes a considerar son aquellos involucrados en la tolerancia a estrés abiótico (frío, sequedad, suelos salinos o degradados, etc), los que eventualmente podrían permitir, mediante un programa de mejoramiento genético vía transgenosis, aumentar la superficie de cultivo, así como de reducir el riesgo de pérdida de cultivares por condiciones meteorológicas desfavorables. Una fuente real de dichos genes son las plantas nativas, las que por su distribución geográfica, están expuestas a condiciones ambientales extremas, tal es la situación de *Lycopersicon chilense* (tomate), cuyo hábitat natural es el desierto de Atacama. Esta especie, es parte del patrimonio genético vegetal que nuestra nación posee y que hasta ahora no ha sido estudiada con estos propósitos por investigadores nacionales.

Por lo anteriormente expuesto en este proyecto se propone realizar el aislamiento de genes de tolerancia a estrés abiótico desde la planta nativa chilena *Lycopersicon chilense*, con el propósito de crear un banco de genes que puedan ser utilizados con fines biotecnológicos en el mejoramiento genético de plantas de interés agrícola.





5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El desarrollo tecnológico, en una concepción de largo plazo, debe considerar dos aspectos esenciales: a) el manejo de los recursos naturales en relación con aspectos como la biodiversidad y conservación del medio ambiente y b) la comprensión, manejo y generación de nuevas tecnologías productivas, que aseguren mayor eficiencia, menor consumo energético y menor impacto ambiental. La biotecnología moderna ha emergido como una alternativa adecuada para tales fines, razón por la cual ha experimentado una expansión notable en las últimas dos décadas, previéndose un desarrollo aún mayor en los años venideros. El auge de esta disciplina está impactando significativamente áreas productivas muy diversas y entre ellas, en forma notable, al sector agroforestal.

La investigación en biotecnología vegetal —realizada principalmente por empresas privadas en los países desarrollados— ha generado una amenaza para el resto de las naciones, como consecuencia de la aplicación de protecciones y patentes a los recursos vegetales y al conocimiento requerido para su aprovechamiento. Ello se traduce en crecientes restricciones en el acceso a: 1) el germoplasma y los recursos fitogenéticos indispensables para el trabajo de mejoramiento genético, 2) razas con características deseadas y empleadas para la generación de nuevas variedades, 3) nuevas variedades comerciales, nuevos productos y sus usos y aplicaciones y 4) las innovaciones técnicas implicadas en la creación de nuevas variedades y productos.

En respuesta a tal situación, numerosos países en vías de desarrollo, como India, México, Cuba, Brasil, y Argentina, entre otros, han establecido sus propios programas de investigación y desarrollo en biotecnología, a fin de mejorar y aumentar sus capacidades productivas y competitivas. Considerando la importancia que el sector agroforestal posee dentro de la actividad económica del país, Chile no puede sustraerse a esta tendencia. El excelente posicionamiento a nivel mundial logrado por este sector se ha basado, fundamentalmente, en las favorables condiciones agroclimáticas y fitosanitarias del país y en la capacidad para introducir y adaptar tecnologías originadas en los países desarrollados. Sin embargo, nuevos incrementos en competitividad presentan creciente dificultad, toda vez que el área silvoagrícola depende, en gran medida, de variedades generadas en el extranjero. Por lo anterior, resulta indispensable desarrollar la capacidad nacional en investigación y desarrollo en biotecnología vegetal, potenciando el uso de los recursos genéticos nativos de modo de generar mayor independencia tecnológica.

El desarrollo de la biotecnología vegetal en el país es aún muy limitado e insuficiente. Entre las múltiples causas que restringen la expansión de esta disciplina, dos aparecen como de especial gravitación: 1) una muy escasa diversificación de las metodologías y tecnologías utilizadas y 2) la escasez de recursos humanos de alta calificación para la investigación y desarrollo en biotecnología vegetal. Al respecto, la propuesta del Programa Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal, elaborada en 1995 por una comisión de expertos de la FAO, patrocinada por el Ministerio de Agricultura, sugiere conceder especial prioridad a la resolución de estos aspectos fundamentales a través de:





* **La diversificación de la investigación científica hacia áreas de la biotecnología vegetal de menor desarrollo en el país, como la manipulación y transferencia de genes (transgenosis) y el análisis de genomas vegetales.**

* **La formación de los recursos humanos requeridos, mediante la realización de estudios de postgrado en disciplinas relacionadas a la biotecnología vegetal y estadías de perfeccionamiento en el extranjero para investigadores.**

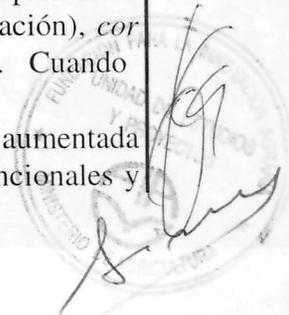
Desde esta perspectiva la implementación de programas de investigación destinados a superar la situación nacional en biotecnología vegetal aparece como una tarea de Estado, donde deben aprovecharse al máximo las escasas capacidades humanas y los recursos genéticos que el país actualmente posee.

En este contexto, la generación de bancos de genes provenientes de los recursos fitogenéticos que se encuentran disponibles en las plantas nativas del país, constituyen la base biológica indispensable para iniciar programas de mejoramiento genético vía transgenosis de especies de importancia económica en el área silvoagropecuaria. Por otra parte, es importante la difusión informativa y formadora en la ciudadanía, con la finalidad de corregir errores y crear una conciencia social sobre la relevancia que tiene el desarrollo de la biotecnología vegetal para la sustentabilidad económica y la protección del medio ambiente.

La mayoría de las plantas de importancia agrícola se ven afectadas, durante su crecimiento, por factores ambientales adversos que limitan su desarrollo. Algunos de estos factores son difíciles de predecir ya que dependen de las condiciones meteorológicas y climatológicas, dejando a los productores en una constante situación de riesgo no calculado y de desamparo cuando dichas condiciones adversas son extremas. Dos de estos estrés abiótico de gran importancia para los agricultores son: las bajas temperaturas y la sequedad o falta de agua o deshidratación. Así también, resulta ser limitante para la expansión geográfica de los cultivos, la calidad del suelo o el grado de salinidad de ellos. Aunque las plantas poseen mecanismos fisiológicos de protección ante estos diversos tipos de estrés, los que se manifiestan en la síntesis de varios tipos de proteínas y pequeñas moléculas incluyendo la acumulación de azúcares, prolina, y glicina betaina, así como la inducción de genes específicos, en la mayor parte de las plantas cultivadas estos resultan insuficientes para contrarrestar el efecto del estrés a la cual es sometida.

En los últimos años gran interés ha despertado el aislar y caracterizar los genes específicos inducidos bajo las diferentes condiciones de estrés abiótico. Así una variedad de genes comunes son inducidos tanto por deshidratación como por bajas temperaturas. Estos genes no solo tienen por función proteger a las células mediante la producción de proteínas metabólicas importantes y protectores celulares, sino que también en la regulación de genes que están involucrados en la transducción de la respuesta de la señal de estrés. En *Arabidopsis* estos genes incluyen *rd* (respuesta a deshidratación), *erd* (respuesta temprana a deshidratación), *cor* (regulado por frío), *lti* (inducido por bajas temperaturas) y *kin* (inducible por frío). Cuando

alguno de estos genes son sobreexpresados en plantas transgénicas, estas presentan aumentada su tolerancia al estrés, lo cual demuestra que los productos de estos genes son funcionales y





que pueden ser utilizados eficientemente para potenciar la defensa de las plantas cultivadas a dicho estrés. Así como estos genes, otros de características similares han sido aislados de diferentes fuentes. Sin embargo, la mayoría de ellos se encuentran o lo estarán en el futuro protegidos por patentes que impiden su libre utilización en programas de mejoramiento genético vía transgenosis.

En concordancia a lo anterior, la biodiversidad en cuanto a recursos fitogenéticos que presenta nuestra nación, constituyen una ventaja que no ha sido hasta ahora debidamente explotada. En este sentido, las plantas nativas que por su distribución geográfica han logrado adaptarse a condiciones ambientales extremas, son una fuente natural de genes involucrados en la tolerancia a estrés abiótico. Así, *Lycopersicon chilense*, única especie de tomate nacional, cuya habitat natural es desde los 100 a los 3000 metros de altitud en el desierto de Atacama, se encuentra sometida a la acción de: a) cambios bruscos de temperatura que oscilan entre los -10 °C por la noche y los 40 °C en el día; b) condiciones de estrés hídrico extremo, ya que solo reciben agua esporádicamente como resultado de inundaciones provocadas por el llamado invierno Boliviano, mientras que durante el resto del año solo se limitan a absorber la humedad producida por la denominada camanchaca; c) suelos degradados y altamente salinos, debido a que esta zona se caracteriza por carecer de suelos fértiles propios del desierto. De acuerdo a estos antecedentes, parece lógico el que esta planta se utilice directamente en programas de mejoramiento genético por cruzamiento con especies comerciales de *Lycopersicon esculentum* (tomate). Sin embargo, ello no es posible debido a incompatibilidad sexual entre ambas plantas. Por lo tanto, la estrategia más conveniente en este caso es aislar y caracterizar dichos genes para traspasarlos a las plantas cultivadas mediante transgenosis.

Por otra parte, no todos los genes de patrimonio genético de estas plantas nativas son útiles para realizar biotecnología vegetal, por cuanto no parece apropiado en estos casos iniciar programas de secuenciamiento genético. La alternativa entonces es utilizar metodologías rápidas y eficaces para aislar aquellos genes que sirvan a estos intereses. Con propósitos similares a los descritos varios métodos han sido tradicionalmente utilizados, tales como: genotecas sustractivas, mutagenesis insercional, differential display, secuenciación a gran escala de cDNA, entre otros. Todos los cuales, tienen ventajas y desventajas. Estas últimas suelen ser corregidas cuando se utilizan conjuntamente diferentes métodos. En este proyecto se utilizarán algunas de estas técnicas las que se encuentran contenidas en una nueva metodología denominada hibridación por supresión substractiva (SSH), lo que permite superar las desventajas de la técnicas individuales. Por otra parte nosotros llevamos algunos años caracterizando el genoma de *Lycopersicon chilense*, razón por la poseemos la herramientas moleculares y las capacidades humanas necesarias para llevar a cabo de manera eficiente un proyecto de las características aquí enunciadas.





6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

En una economía globalizada como la que se desarrolla en nuestro país y consistente con los nuevos acuerdos comerciales suscritos con diferentes bloques internacionales, se requiere de un constante y persistente perfeccionamiento de la capacidad productiva, con la finalidad de aumentar su nivel de competitividad por los mercados. Esta situación es especialmente relevante en el caso del área silvoagropecuaria, la cual ha logrado un lugar de preminencia como resultado de la adaptación de tecnologías extranjeras y a condiciones fitosanitarias favorables. Sin embargo, la creciente competitividad, conjuntamente con la privatización de la información y la tecnología, obligan a generar las condiciones científicas y tecnológicas necesarias e indispensables para hacer sustentable el posicionamiento logrado en los mercados por el sector silvoagropecuario nacional.

Este proyecto ofrece la posibilidad de utilizar parte del patrimonio fitogenético nacional para generar un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico con el propósito de utilizarles en programas de mejoramiento genético de especies cultivables vía transgenosis. Este banco de genes que quedará a disposición de los investigadores nacionales, resulta indispensable para lograr la independencia tecnológica en el área silvoagropecuaria y comenzar a equiparar nuestro nivel en biotecnología vegetal respecto de las naciones desarrolladas y de nuestro entorno, para así hacer frente a la creciente competitividad por los mercados internacionales.

Por otra parte en este proyecto se pretende realizar un programa de difusión hacia la ciudadanía y transferencia tecnológica a las escuelas de agronomía e ingeniería forestal, con el objeto de informar, presentar las posibilidades de utilización de las nuevas tecnologías y crear una conciencia nacional de la relevancia de la biotecnología vegetal para la sustentabilidad económica de la agricultura nacional y la protección del medio ambiente.





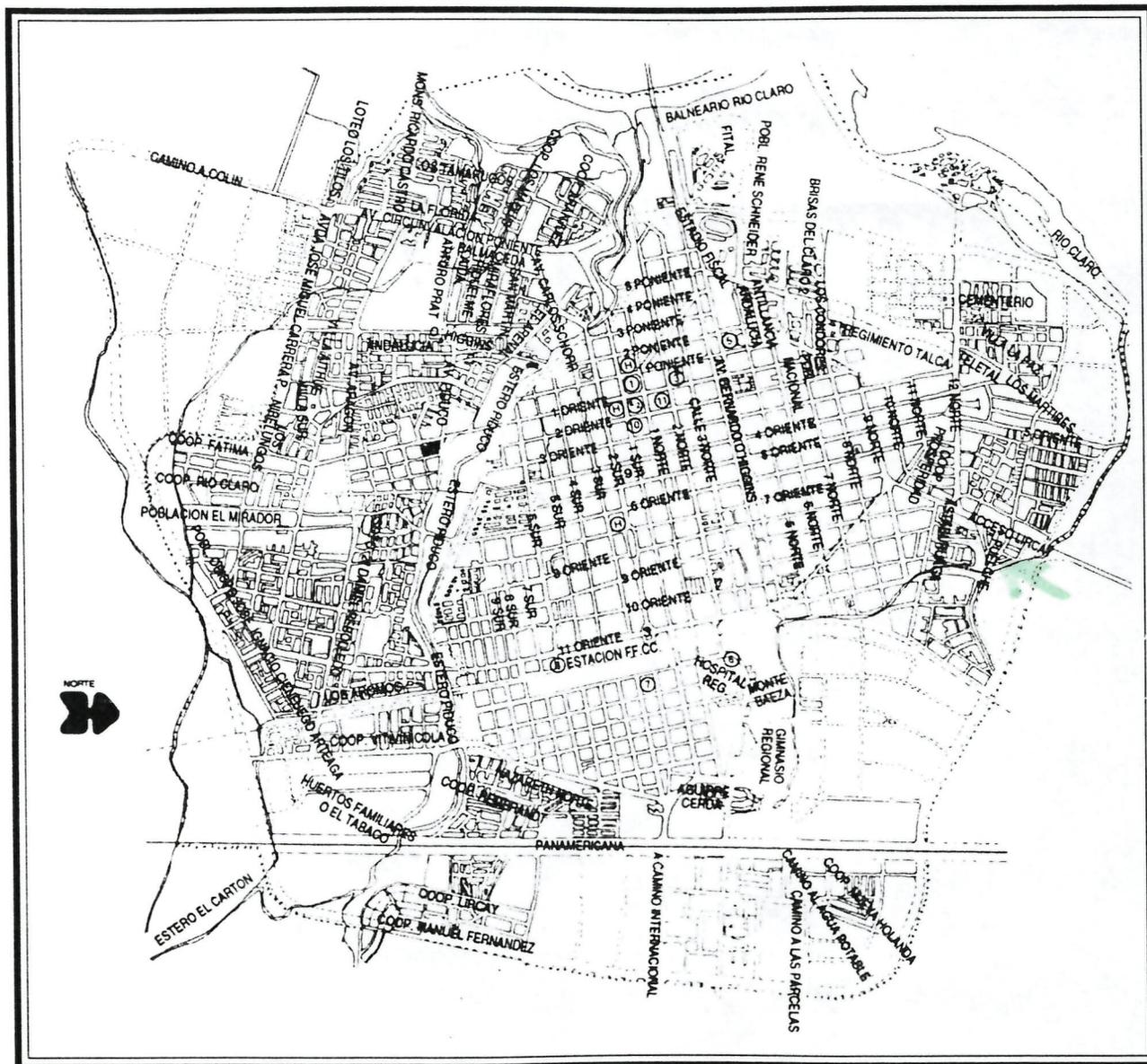
7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

(Anexar además un plano o mapa de la ubicación del proyecto)

El proyecto se desarrollará en el Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología de la Universidad de Talca. Este Instituto se encuentra localizada en el Campus Lircay el que a su vez se ubica en el acceso Norte de la ciudad de Talca y en el lado oriente de la avenida Lircay.



PLANO DE LA CIUDAD DE TALCA





8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

8.1. GENERAL:

Generar un banco de genes de tolerancia a estrés abiótico aislados y caracterizados del genoma de la planta nativa *Lycopersicon chilense*.

8.2. ESPECÍFICOS:

- 1.- Obtención y propagación del material vegetal a utilizar en el desarrollo del proyecto.
- 2.- Identificar transcritos diferencialmente expresados en plantas de *L.chilense* sometidas a estrés hídrico.
- 3.- Identificar transcritos diferencialmente expresados en plantas de *L.chilense* sometidas a estrés salino.
- 4.- Identificar transcritos diferencialmente expresados en plantas de *L.chilense* sometidas a estrés por temperaturas bajas.
- 5.- Aislar los genes correspondientes a los transcritos de expresión diferencial que estén relacionados a la tolerancia de las diferentes condiciones de estrés abiótico analizadas.
- 6.- Caracterizar los genes aislados. Determinación de su secuencia nucleotídica e identificación de elementos regulatorios de la expresión génica.
- 7.- Evaluar la especificidad de expresión de los genes aislados en plantas transgénicas heterólogas (arabidopsis y tomate).
- 8.- Dotar de la estructura tecnológica básica para la ejecución del Proyecto.





9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

(Describir en detalle la metodología y procedimientos a utilizar en la ejecución del proyecto)

1.- Establecimiento de las condiciones de estrés abiótico de las plantas de *L. chilense*.

Plantas provenientes de semillas de *L. chilense*, serán crecidas en macetas en una mezcla de vermiculita, perlita y turba (1:1:1) y en cultivo *in vitro* en medio Murashige Skoog en 0.8 % agar. Las plantas crecidas en macetas serán regadas con una solución nutritiva de MS al 1% una vez a la semana. Las plantas de *L. chilense* serán crecidas en cámaras climáticas a 22 °C bajo un fotoperiodo de día largo (16 horas luz, 8 horas oscuridad) con una iluminación de 150 $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$. Cuando las plantas alcancen su estado vegetativo activo (6 semanas), estas serán sometidas a la acción de:

- Estrés por deshidratación*: Las plantas serán dejadas sin riego hasta que sus hojas pierdan el 50% de su peso fresco. Sin embargo, hojas serán colectadas cuando presenten una pérdida del 10, 25 y 50% de su peso fresco. Estas hojas serán congeladas en nitrógeno líquido.
- Estrés salino*: Inicialmente las plantas serán regadas con solución nutritiva suplementada con 250 mM de NaCl, considerada como valor de referencia para la inducción de genes por estrés salino en *Arabidopsis*. Después de 12 horas las hojas serán colectadas y congeladas en nitrógeno líquido.
- Estrés por temperaturas bajas*: Las plantas serán transferidas a cámaras de crecimiento a 4 °C, lugar donde permanecerán por diferentes tiempos manteniendo el fotoperiodo anterior. Hojas de estas plantas de *L. chilense* serán colectadas a las 12, 24, 48 y 72 horas. Otro grupo de plantas de *L. chilense* serán aclimatadas a frío siguiendo un riguroso protocolo de ir reduciendo la temperatura paulatinamente (15, 10, 6 °C) durante un periodo mínimo para cada temperatura de 5 días. Posteriormente la plantas se dejan hasta 21 días a 4 °C, donde sus hojas serán colectadas a los 3, 6, 10, 15 y 21 días y congeladas en nitrógeno líquido.

2.- Extracción de RNA total y purificación de RNA Poli A+.

El RNA total será extraído de las hojas colectadas mantenidas en nitrógeno líquido mediante la utilización del kit SV Total RNA isoaltion system (Promega) siguiendo las intrucciones de los proveedores. Debido a que la calidad del RNA Poli A+ es escecial para la síntesis de cDNA, éste será purificado a partir del RNA total mediante el uso del sistema FastTrack™ 2.0 mRNA isolation kit (invitrogen). Ambos sistemas son comercializados en Chile por Fermelo y BiosChile IGSA respectivamente. Después de la extracción, la integridad de los RNA será visualizada mediante electroforesis en gel de agrosa-formaldehido.

3.- Substracción de cDNA por selección por PCR.





Debido a que en este proyecto se persigue aislar y caracterizar genes de expresión diferencial para estrés abiótico, se realizarán subtracciones de los cDNA obtenidos desde las plantas controles versus los diferentes colecciones de RNAs provenientes de las diferentes condiciones de estrés. De tal manera, que como driver se utilizarán los cDNA de las plantas controles y como tester las del los cDNA obtenidos de las diferentes condiciones de estrés estudiadas. Para realizar la substracción por PCR se usará el sistema Clontech PCR-Select™ cDNA subtraction kit de la empresa Clontech, comercializado en Chile por Biosonda S.A. Todo el procedimiento se realizará de acuerdo a las intrucciones dadas por los proveedores. Los pasos a seguir se pueden resumir en los siguientes: a) Síntesis de cDNA, b) Digestión con la enzima *Rsa I*, c) Ligamiento de los cDNA tester con los adaptadores, d) Supresión por hibridación y amplificación por PCR.

4.- *Clonamiento y secuenciación de los cDNA subtraídos.*

Los cDNAs obtenidos de mRNAs que muestren una expresión diferencial serán clonados directamente en el vector pGEMT (Promega) y serán amplificados en la cepa de *E.coli* DH5 α . Dos cDNAs de expresión diferencial obtenida de cada una de las condiciones de estrés, serán usados como sondas radiactivas para verificar por dot blot de alta astringencia, cual de ellos se encuentran repetidos en las diferentes subtracciones. Esto se realizará con el propósito de seleccionar solo aquellos cDNAs diferentes, los cuales una vez identificados serán enviados a secuenciación nucleotídica a empresas o instituciones nacionales que prestan dicho servicio.

5.- *Comparación por similitud de secuencia en bancos de datos internacionales*

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica de los cDNA de interés, estos serán comparados mediante los algoritmos Blast o FASTA, con los ingresados a los banco de datos internacionales tales como, GeneBank o EMBL. Aquellos que presenten mayor interes serán usados en los próximos análisis.

6.- *Aislamiento de los genes correspondientes a los cDNA obtenidos*

Los cDNAs servirán de sondas radiactivas para buscar en una librerías genómica de *L. chilense* construidas en el fago λ BlueStar (Novagene). Esta librería ya fue construida en nuestro laboratorio. Para aislar dichos genes, se utilizará la técnica de hibridación *in situ* sobre placas, lo cual permite identificar a aquellos fagos que presentan los genes correspondientes. Tales genes serán posteriormente, subclonados en Bluescript y enviados a realizar secuenciación nucleotídica. Mediante su secuencia ellos podrán ser caracterizados para identificar las zonas reguladoras de su expresión.

7.- *Obtención de plantas transgénicas de tomate y arabidopsis.*

a) Construcción de genes quiméricos y transformación de *Agrobacterium tumefaciens*





Del total de genes aislados aquellos que presenten secuencia codificante para proteínas no descritas en la bibliografía ni en los bancos de datos internacionales serán utilizadas para generar plantas transgénicas. Para tales efectos, sus correspondientes genes serán clonados en el vector pBI121. Para realizar dicho clonaje los genes serán primero amplificados agregando a sus extremos 5' y 3' las secuencias de las enzimas de restricción *Hind* III y *Eco*RI. Estos sitios de restricción permitirán clonar los genes y sus respectivos elementos regulatorios de forma tal que reemplacen en el vector al promotor 35S y al gen reportero GUS.

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens* será realizada por electroporación utilizando el sistema Electromax *Agrobacterium tumefaciens* LBA44044 cell (Gibco BRL). Donde 10^4 células en 20 μ l son transformadas con 100 ng de plásmido quimérico en cubetas Cell-porator setting (Gibco BRL) a un voltaje de 400 Volts y una capacitancia de 300 μ F. Luego las células son tomadas desde las cubetas y se les adiciona a un tubo con 1 ml de medio YM donde son agitadas a 225 rpm (30°C) por 3 hrs. Posteriormente son sembradas en placas YM con 50 μ g/ml de Kanamicina y 100 μ g/ml de Estreptomycin e incubadas 48 - 56 hrs a 30 °C. Las colonias resistentes corresponden a las cepas transformadas, las que son crecidas en medio líquido de YM hasta alcanzar una OD de 0.6 a 600 nM.

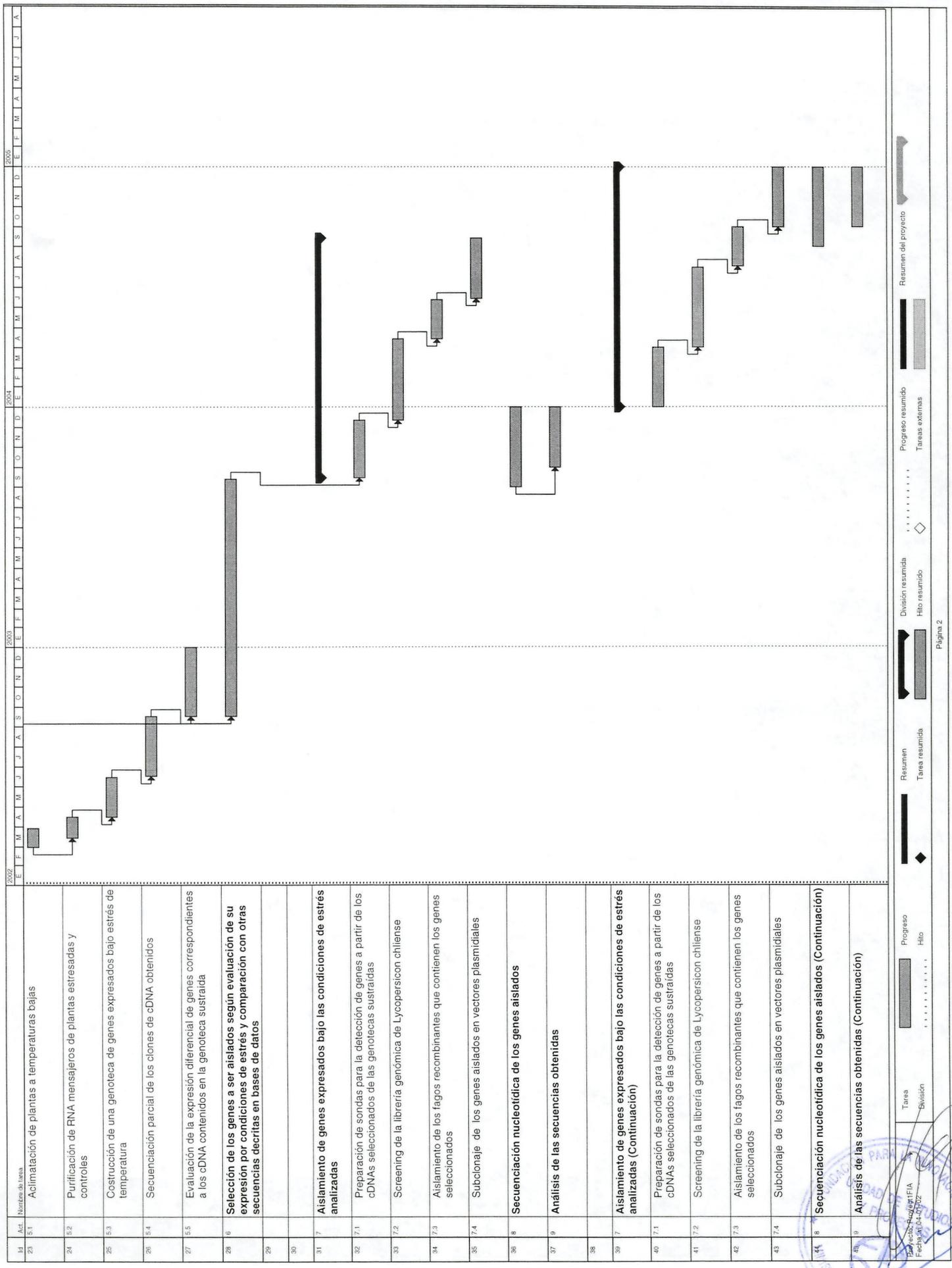
b) Transformación de *A. thaliana* y *Lycopersicon esculentum*.

Con las construcciones quiméricas anteriores se obtendrán plantas transgénicas de tomate y *Arabidopsis*. Para transformar plantas de *A. thaliana*, se utilizará el método de infiltración (Bechtold *et al.*, 1993 CR. Acad. Sci. Paris/Life Science **316**: 1194-1199). Este método requiere el crecimiento, por separado, de las plantas y de la cepa de *A. tumefaciens* portadora de la construcción que va a ser transferida. En el momento apropiado del desarrollo, las inflorescencias de la planta son sumergidas en una suspensión de la bacteria y el conjunto es sometido al vacío. Con ello se consigue que el microorganismo penetre en la planta e infecte las células germinales, las cuales generarán las semillas de la siguiente generación. En el caso de plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) var Money Maker serán llevadas a cabo sobre hipocotilos de acuerdo a una modificación del método descrito por Fillati, Kiser and Rose, 1987 (*Biotechnology* **5**: 726-730). Para seleccionar la descendencia transgénica (generación T1), se utilizará kanamicina en el medio de germinación de las semillas y callos según corresponda. El plásmido pBI121 utilizado en la transformación de *A. tumefaciens* es portador del gen NPTII, el cual confiere resistencia a este antibiótico. La generación de plantas T2 será utilizada en los siguientes experimentos.

8.- Evaluación de la especificidad de expresión de los genes seleccionados en plantas transgénicas.

Las plantas transgénicas serán sometidas a las diferentes condiciones de estrés abióticos descritos en el punto 1 y comparada su respuesta frente a las plantas silvestres y transformadas con pBI121 de tomate y *Arabidopsis* sometidas a iguales condiciones de estrés.





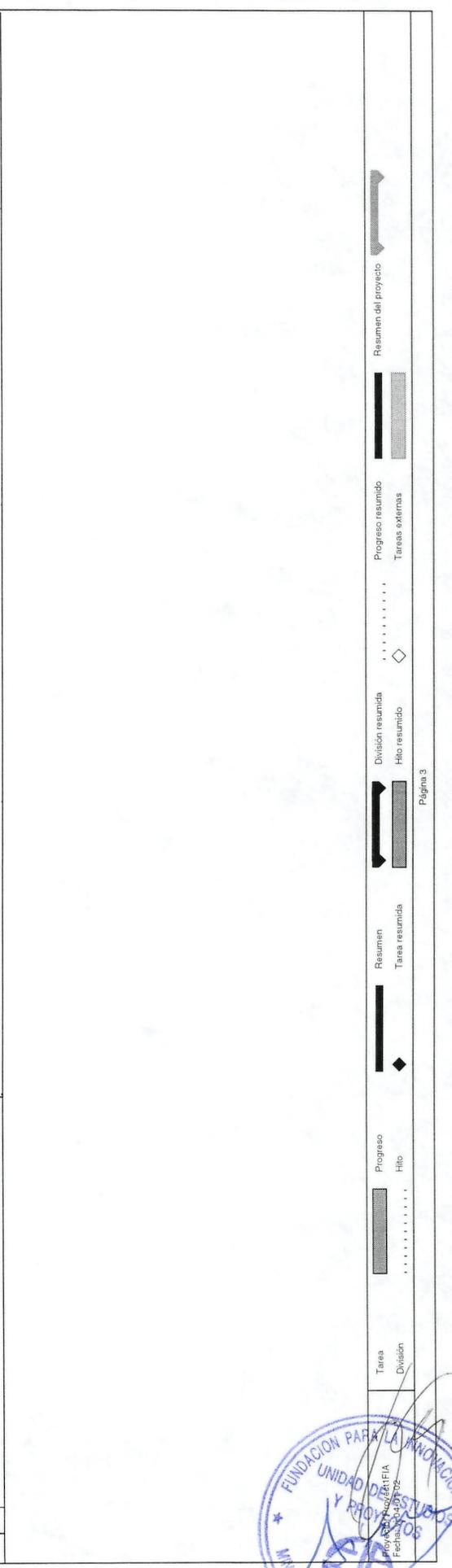
2002 E F F M A M J J A S O N D 2003 E F F M A M J J A S O N D 2004 E F F M A M J J A S O N D 2005 E F F M A M J J A S O N D

Act	Nombres de tareas
23 5.1	Aclimatación de plantas a temperaturas bajas
24 5.2	Purificación de RNA mensajeros de plantas estresadas y controles
25 5.3	Construcción de una genoteca de genes expresados bajo estrés de temperatura
26 5.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos
27 5.5	Evaluación de la expresión diferencial de genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraida
28 6	Selección de los genes a ser aislados según evaluación de su expresión por condiciones de estrés y comparación con otras secuencias descritas en bases de datos
29	
30	
31 7	Aislamiento de genes expresados bajo las condiciones de estrés analizadas
32 7.1	Preparación de sondas para la detección de genes a partir de los cDNAs seleccionados de las genotecas sustraidas
33 7.2	Screening de la librería genómica de Lycopersicon chilense
34 7.3	Aislamiento de los fagos recombinantes que contienen los genes seleccionados
35 7.4	Subclonaje de los genes aislados en vectores plasmidiales
36 8	Secuenciación nucleotídica de los genes aislados
37 9	Análisis de las secuencias obtenidas
38	
39 7	Aislamiento de genes expresados bajo las condiciones de estrés analizadas (Continuación)
40 7.1	Preparación de sondas para la detección de genes a partir de los cDNAs seleccionados de las genotecas sustraidas
41 7.2	Screening de la librería genómica de Lycopersicon chilense
42 7.3	Aislamiento de los fagos recombinantes que contienen los genes seleccionados
43 7.4	Subclonaje de los genes aislados en vectores plasmidiales
44 8	Secuenciación nucleotídica de los genes aislados (Continuación)
45 9	Análisis de las secuencias obtenidas (Continuación)

Progreso resumido
 Tareas resumidas
 División resumida
 Hitos resumidos



Id	Act	Nombre de tarea
46	10	Obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis thaliana y Lycopersicon esculentum
47	10.1	Clonamiento de los genes seleccionados en el vector pBI121
48	10.2	Transformación de Agrobacterium tumefaciens
49	10.3	Transformación de Arabidopsis thaliana y Lycopersicon esculentum
50	10.4	Screening de plantas transformadas
51	10.5	Crecimiento y propagación de plantas transformadas
52	11	Evaluación de la expresión de los genes seleccionados en las plantas transgénicas
53		
54	10	Obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis thaliana y Lycopersicon esculentum (Continuación)
55	10.1	Clonamiento de los genes seleccionados en el vector pBI121
56	10	Transformación de Agrobacterium tumefaciens
57	2	Transformación de Arabidopsis thaliana y Lycopersicon esculentum
58	10.3	Screening de plantas transformadas
59	10.4	Crecimiento y propagación de plantas transformadas
60	11	Evaluación de la expresión de los genes seleccionados en las plantas transgénicas (Continuación)





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
8	1	Adquisición de equipos	02/1	30/03
		Contacto con Proveedores		
		Despacho de Ordenes de Compra		
		Recepción de equipos e instalación		
1	2	Obtención de una colección de plantas de <i>L. chilense</i>		
1	2.1	Recolección de semillas de <i>L. chilense</i>	20/01	25/01
1	2.2	Preparación y siembra de semillas	25/01	30/01
1	2.3	Cultivo y replicación de plantas	1/2	15/03
2	3	Construcción de una genoteca de cDNAs correspondiente a genes expresados bajo estrés hídrico	1/3	30/12
2	3.1	Sometimiento de Plantas a estrés hídrico	1/3	30/3
2	3.2	Purificación de RNA mensajeros de plantas estresadas y controles	15/3	15/4
2	3.3	Hibridación sustractiva	15/4	15/6
2	3.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos	15/6	15/9
2	3.5	Evaluación de la expresión diferencial de genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraída	15/9	30/12
3	4	Construcción de una genoteca de cDNAs correspondiente a genes expresados bajo estrés salino		
3	4.1	Sometimiento de plantas a éstress salino	1/3	30/3
3	4.2	Purificación de RNA mensajeros de plantas estresadas y controles	15/3	15/4
3	4.3	Hibridación sustractiva	15/4	15/6
3	4.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos	15/6	15/9
3	4.5	Evaluación de la expresión diferencial de	15/9	30/12





		genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraída		
4	5	Construcción de una genoteca de cDNAs correspondiente a genes expresados a temperaturas bajas		
4	5.1	Aclimatación de plantas a temperaturas bajas	1/3	30/4
4	5.2	Purificación de RNA mensajeros de plantas estresadas y controles	15/4	15/5
4	5.3	Hibridación sustractiva	15/5	15/7
4	5.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos	15/6	15/9
4	5.5	Evaluación de la expresión diferencial de genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraída	15/9	30/12
5	6	Selección de los genes a ser aislados según evaluación de su expresión por condiciones de estrés y comparación con otras secuencias decritas en bases de datos	1/11	30/12





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2004

Objetivo Especif. Nº	Actividad Nº	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
5	7	Aislamiento de genes expresados bajo las condiciones de estrés analizadas (Continuación)	2/01	30/12
5	7.1	Preparación de sondas para la detección de genes a partir de los cDNAs seleccionados de las genotecas sustraídas		
5	7.2	"Screening" de la librería genómica de <i>Lycopersicon chliense</i>		
5	7.3	Aislamiento de los fagos recombinantes que contienen los genes seleccionados		
5	7.4	Subclonaje de los genes aislados en vectores plasmidiales		
6	8	Secuenciación nucleotídica de los genes aislados (Continuación)	01/9	30/12
6	9	Análisis de las secuencias obtenidas (Continuación)	1/10	30/12
7	10	Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i>	2/1	30/12
7	10.1	Clonamiento de los genes seleccionados en el vector pBI121		
7	10.2	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
7	10.3	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i>		
7	10.4	"Screening" de plantas transformadas		
7	10.5	Crecimiento y propagación de plantas transformadas		
7	11	Evaluación de la expresión de los genes seleccionados en las plantas transgénicas	1/7	30/12





11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1. Resultados esperados por objetivo

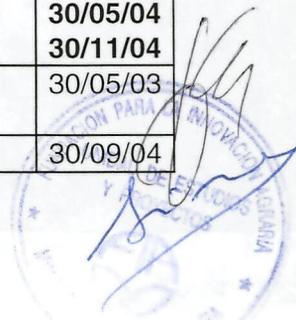
Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1	Colección de plantas de <i>Lycopersicon chilense</i>	N° de plantas	100	100	30/3/02
2	Genoteca sustraída de genes de expresión inducida por estrés hídrico	N° de clones evaluados	30	30	30/12/02
3	Genoteca sustraída de genes de expresión inducida por estrés salino	N° de clones Evaluados	30	30	30/12/02
4	Genoteca sustraída de genes de expresión inducida por temperaturas bajas	N° de clones evaluados	30	30	30/12/02
5	Genes aislados desde una librería genómica de <i>Lycopersicon chilense</i>	N° de genes aislados	15	5 5 5	30/11/03 30/05/04 30/11/04
6	Secuencia nucleotídica de genes aislados	N° de genes secuenciados	15	5 5 5	30/12/03 30/08/04 30/12/04
7	Plantas transgénicas construídas	N° de plantas obtenidas	30	10 10 10	30/06/04 30/12/04 30/06/05
8	Plantas transgénicas analizadas	N° de plantas analizadas	30	10 10 10	30/11/04 30/06/04 30/10/05

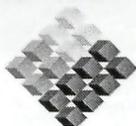




11.2. Resultados esperados por actividad

Obj. Esp. Nº	Activid. Nº	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
1	2	Colección de plantas de <i>L. chilense</i>	Nº de plantas	100	100	30/3/02
2	3	Genoteca de cDNAs correspondiente a genes expresados bajo estrés hídrico	Nº de clones disponibles	20	20	30/12/02
2	3.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos	Nº clones secuencia -dos	20	20	15/9/02
2	3.5	Evaluación de la expresión diferencial de genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraída	Nº de clones evaluados	20	20	30/12/02
3	4	Genoteca de cDNAs correspondiente a genes expresados bajo estrés salino	Nº de clones disponibles	20	20	30/12/02
3	4.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos	Nº clones secuencia -dos	20	20	15/9/02
3	4.5	Evaluación de la expresión diferencial de genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraída	Nº de clones evaluados	20	20	30/12/02
4	5	Genoteca de cDNAs correspondiente a genes expresados a temperaturas bajas	Nº de clones disponibles	20	20	30/12/02
4	5.4	Secuenciación parcial de los clones de cDNA obtenidos	Nº clones secuencia dos	20	20	15/9/02
4	5.5	Evaluación de la expresión diferencial de genes correspondientes a los cDNA contenidos en la genoteca sustraída	Nº de clones evaluados	20	20	30/12/02
5	6	Selección de genes a ser aislados	Nº de genes	15	15	30/12/02
5	7	Genes aislados desde una librería genómica de <i>L. chilense</i>	Nº de genes aislados	15	5 5 5	30/11/03 30/05/04 30/11/04
5	7.1	Sondas para la detección de genes	Nº de sondas	15	15	30/05/03
	7.2	Fagos recombinantes	Nº de	15	15	30/09/04





5	7.3	que contienen los genes seleccionados	fagos aislados			
5	7.4	Subclones en vectores plasmidiales	N° de clones aislados	15	15	30/11/04
6	8	Secuencia nucleotídica de genes aislados	N° de genes secuenciados	15	5 5 5	30/12/03 30/06/04 30/12/04
6	9	Análisis de secuencias nucleotídicas	N° de secuencias analizadas	15	5 5 5	30/12/03 30/08/04 30/12/04
7	10	Plantas transgénicas construídas	N° de plantas obtenidas	30	10 10 10	30/06/04 30/12/04 30/06/05
7	10.1	Genes clonados en el vector pBI121	N° de clones	15	5 5 5	30/03/04 30/09/04 30/03/05
7	10.3 10.4 10.5	Plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i>	N° de plantas transformadas	150	50 50 50	30/06/04 30/12/04 30/06/05
7	11	Análisis de la especificidad de expresión génica en plantas transgénicas	N° de plantas analizadas	90	30 30 30	30/11/04 30/06/05 30/10/05





13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

El proyecto no presenta efectos ambientales adversos. La Universidad de Talca tiene a disposición de sus investigadores, una sala completamente equipada para realizar transformación de plantas, cámaras de crecimiento para el cultivo *in vitro* de plantas y una zona de bioseguridad para trabajo con organismos fitopatogénicos. Además, posee una zona de tratamiento y eliminación de residuos radioactivos y tratamiento y eliminación de organismos patógenos. Asimismo, se establece un acucioso y continuo monitoreo de cada una de estas dependencias, como también la participación activa de un Comité de Ética y Bioseguridad que supervisa en estas áreas los proyectos emanados de esta casa de estudios superiores. En adición, el proyecto no contempla en primera instancia la aplicación de los resultados obtenidos en campo.

13.2. Acciones propuestas

13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)





15.2. Aportes de contraparte: criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

(para cada uno de los ítems de gasto se deberán especificar los criterios y metodología de valoración utilizada)

APORTES UNIVERSIDAD DE TALCA

1.- Recursos Humanos

En el ítem recursos humanos, el valor hora de los especialistas se determinó según la escala utilizada por la Universidad para sus académicos. Este valor se multiplicó por el tiempo (horas/año) de dedicación de cada especialista del proyecto. Así también se consideró valor hora de técnico y de secretaria en base a los mismos criterios.

La escala de valores hora determinada fue la siguiente:

<u>Categoría Académica</u>	<u>Valor (\$/hora)</u>
Académico	16.182

<u>Categoría Funcionarios</u>	<u>Valor (\$/hora)</u>
Profesional Técnico de Laboratorio	6.141
Secretaria	4.185

En el periodo del año 2001 se consideran solo dos meses de gastos.

2.- Servicios a Terceros

En este ítem se valoró aquellos aportes consistentes en el uso de algún bien de la Universidad para el desarrollo del proyecto.

- Uso de laboratorios. En este proyecto se utilizarán completamente dos laboratorios con todos sus equipos. De tal manera, que los valores dados son mínimos considerando la infraestructura que ellos poseen.
- Uso de Instalaciones Generales: Aquí se incluyen gran cantidad de dependencias y equipos, tales como: Cámaras de Crecimiento, Cuartos de radioactividad, cuartos Fotográficos, Sala de Transformación de Plantas, Sala de equipos (centrífugas, espectrofotómetro, speed-vac, etc). Así también está incluido uso de oficinas, teléfono, internet, impresoras, biblioteca.

3.- Aportes Gastos de Operación

La universidad ha iniciado un Programa de investigación en Biotecnología Vegetal, para lo cual hará un aporte de 50 millones para gastos en materiales e insumos. Estos fondos están distribuidos en los años 2002, 2003, 2004.





15.2. Aportes de contraparte: criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

(para cada uno de los ítems de gasto se deberán especificar los criterios y metodología de valoración utilizada)

APORTE DE EMPRESA SERVICIOS INTEGRALES EN BIOTECNOLOGÍA LTDA.

Difusión

Los aportes que hará esta empresa a través de su revista BIOPLANET están valorizados en gastos de material Editorial y de Publicidad, por lo que las dos hojas que se utilizarán para cada transferencia tecnológica vía esta revista, la empresa mencionada subsidiará el 50% de los costos totales.





15.4. Financiamiento solicitado a FIA: criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

(para cada uno de los ítems de gasto se deberán especificar los criterios y metodología de valoración utilizada)

1.- Recursos Humanos

Para la ejecución total del proyecto, desde el 01 de Enero de 2002 hasta 31 de Octubre de 2005, se contempla la cancelación de incentivos solo al Coordinador General del proyecto y al coordinador alterno. Los valores asignados están de acuerdo al grado de responsabilidad y de dedicación al proyecto.

Debido al intenso trabajo en el manejo de plantas en cultivo *in vitro* y en macetas, así como a la cantidad de trabajo en biología molecular se consideró la contratación por una jornada completa de una Licenciada en Biología como Profesional Técnico de Laboratorio con una renta bruta mensual inicial de 356.004 pesos incrementales de acuerdo a cuadro flujo de caja.

2.- Equipamiento

Para la ejecución del proyecto es necesario complementar la infraestructura que posee la Universidad de Talca. Esto es debido a la gran cantidad de plantas, condiciones diferentes a las que serán sometidas, mantenimiento de material biológico y manipulación del material y de la información obtenida, así como los resultados y manejo contable del Proyecto. Estas razones justifican el porque de la adquisición de:

Cámara de Crecimiento de Plantas con temperatura, fotoperíodo y humedad controlada. Termos criopreservantes para nitrógeno líquido, mantenimiento de hojas y RNAs.

Freezer de -20 °C, para mantenimiento de Kits, reactivos y enzimas que deben guardarse a esta temperatura.

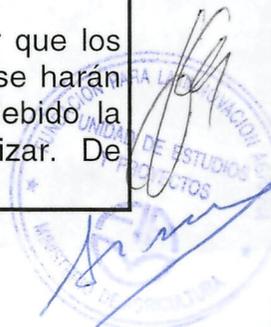
Refrigerador para guardar soluciones, tampones, antibióticos y medios de cultivo, así como también las genotecas genómica y de cDNAs.

Computador portátil, para manejo de los resultados, transportar banco de imágenes y análisis con bancos de datos internacionales.

Los precios son referenciales y se adjunta las cotizaciones más baratas otorgadas por los proveedores a los cuales se les solicito dicha información.

3.- Infraestructura Tecnológica

Para marzo se espera la habilitación de una sala de PCR. A pesar que los laboratorios cuentan con lugares determinados para esta actividad, estos se harán insuficientes para el número de personas trabajando simultáneamente debido la gran cantidad de reacciones de estas características que habrá que realizar. De tal manera que





resulta imprescindible contar con una sala debidamente acondicionada para tales efectos. Se contempla que dicha sala debe contener mesones adecuados, instalaciones de agua y gas, así como también debe pintarse y realizar adecuaciones para su mejor aislamiento. Todo lo cual se ha valorizado en función de los costos de los maestros carpinteros, gafiter y pintores que la Universidad contrata regularmente para este tipo de trabajos.

4.- Movilización, viáticos y combustibles

Se contempla un viaje a la Ciudad de Arica para la recolección de semillas en el lugar denominado Cuesta Candelabros, lugar donde se encuentra la población más abundante de *Lycopersicon chilense*. Los costos de pasajes aéreos fueron cotizados en la Agencia de viajes Onuba en Talca. Los viáticos están asignados considerando un valor de 35.000 cuando incluye alojamiento fuera de la Ciudad de Talca. También se considera viajes a Santiago para la búsqueda y traslado de material biológico. Por otra parte se considera la asistencia a Congresos durante los años 2002, 2003 y 2004 para lo cual se incluyen un valor reajustado del viático por año.

5.- Materiales e Insumos

Los reactivos, Kits, y material básico de laboratorio para el trabajo en Biología Molecular, es de elevado costo, debido principalmente a que todo el material es importado. Esto hace que los precios sean regularmente recargados en su costo real en un 100%, debido gastos de flete aéreo, desaduanaje, impuestos y ganancia de los proveedores nacionales. Por otra parte, hay insumos como la radiactividad que tienen una corta vida media y por lo tanto es preciso comprarlos continuamente. Las cantidades solicitadas son referenciales a los costos que normalmente se trabaja en estos laboratorios. Mayores antecedentes se encuentran adjuntos.

6.- Servicios a Terceros

Se contempla pagos para realizar en una sola oportunidad un pago por análisis de suelo que se realiza en el laboratorio de análisis de suelos de la Universidad y que tiene valores reducidos para sus unidades académicas. Así también, se cancelarán servicios de síntesis de oligonucleótidos y secuenciación nucleotídica. Hasta ahora la Universidad no cuenta con dichos servicios y por lo tanto deberán ser enviados a otras universidades o empresas privadas. Finalmente también se considera la adquisición de libros y revistas que sean de importancia para la consecución de los objetivos del Proyecto y que no se encuentren en la Biblioteca de la Universidad de Talca.

7.- Difusión

El costo de dos páginas en un número de la revista BIOPLANET tiene un costo de 600 mil pesos de los cuales, la empresa Servicios Integrales en Biotecnología LTDA, se comprometió a través de su Director Sr. Jorge Gatica,





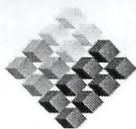
financiar una página. Debido a que se pretenden hacer dos publicaciones en el año incluyendo una al iniciar y otra al terminar el proyecto, lo solicitado es por un monto de 2.400.000 pesos. Los gastos de publicaciones y presentaciones a Congresos están asumidos en costos de material fotográfico y de disquet. Para las inscripciones a los congresos se consideró 100.000 pesos por año.

Al Finalizar el Proyecto se realizará un Simposio Internacional que tendrá una duración de tres días. Para tales efectos, se solicita para financiar dicho evento, la cantidad de 5.000.000 pesos. Estos dineros serán utilizados para costear los pasajes aéreos y la estadía de dos investigadores extranjeros y de dos nacionales. Así también se costearán los pasajes y estadías de 6 estudiantes de Doctorados de otras Universidades nacionales, 4 estudiantes de Magister y 20 estudiantes de Escuelas de Agronomía de otras Universidades del país. Los costos de promoción de dicho Simposio, también están incluidos en el monto solicitado.

8.- Gastos Generales y de Administración

El material de fotocopias se estimó en base a necesidades. También en este ítem se incluyen los gastos de administración que realiza la universidad. Este ítem no supera el 10% de los costos del proyecto.





Justificación recursos correspondientes a insumos y materiales solicitados

En razón a las metas planteadas este debe ser considerado un megaproyecto. La obtención de un alto número de genes de respuesta a estrés en plantas, caracterizados estructural y funcionalmente, implican un numerosas etapas con un altísimo volumen de trabajo. En consecuencia, las actividades programadas para este proyecto demandarán una gran cantidad de insumos, reactivos de laboratorio y servicios, todos ellos de un costo elevado. Un análisis general de los principales requerimientos previstos y sus costos se desglosa como sigue:

Producto	Cantida d	Costo Unitario	Costo Total
Kit para purificación de RNA de plantas RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	8	280.000	2.240.000
Kit para síntesis de cDNA First strand synthesis for RT-PCR (Invitrogen)	8	250.000	2.000.000
Kit para hibridación sustractiva PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech)	3	1.200.000	3.600.000
Kit para marcación de sondas Random primer labelling system (Invitrogen)	3	120.000	360.000
Kits para construcción de genotecas de expresión LambdaZAPII cloning and packaging kit (Stratagene)	2	800.000	1.600.000
Kit para purificación de fagos Wizard Lambda Preps (Promega)	8	100.000	800.000
Kit para amplificación de fragmentos de gran tamaño ELongase amplification system (Invitrogen)	2	260.000	520.000
Kit para clonamiento de productos de PCR Topo DNA cloning system (Invitrogen)	8	250.000	2.000.000
Kit de marcación de sondas para hibridación <i>in situ</i> DIG RNA labelling kit SP6/T7 (Roche)	2	450.000	900.000
Kit de detección no-radiactiva para hibridación <i>in situ</i> DIG Nucleic acid detection kit (Roche)	2	350.000	700.000
Isotopos radiactivos para marcación de sondas P ³² - α -dATP 1mCi /100 μ l (NEN)	16	250.000	4.000.000
Kit para purificación de DNA plasmidial Concert rapid plasmid purification system (Invitrogen)	30	70.000	2.100.000
Kit para extracción de DNA desde geles de agarosa Prep-A-Gene System (Biorad)	3	200.000	600.000
Enzima para PCR de alta fi delidad Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen)	4x100U	90.000	360.000
Enzima para PCR de rutina Taq DNA polimerase (Invitrogen)0	16x500U	150.000	2.400.000





Endonucleasas de restricción Selección de las más utilizadas (20 enzimas)	80	50.000	4.000.000
Otras enzimas (DNA polimerasa Klenow, DNA ligasa, DNAsa -RNAsa free, nucleasa S1, RNAsa., Proteinasa K, etc)			4.000.000
Servicio de síntesis de oligonucleotidos Oligos de 25 nucleotidos	200	25.000	5.000.000
Servicio de secuenciación automática de DNA Corridas de aprox. 600 nts c/u	200	50.000	10.000.000
Estandar de peso molecular para DNA y proteínas 1 KB ladder, 100 bp ladder, estandar preteñidos para geles PAGE-SDS, etc)			2.000.000
Reactivos calidad Biología Molecular (agarosa, acrilamida, formamida, formaldehido, Tris, urea, ácido bórico, citrato de sodio, BSA, PVR-360, ficol, PEG8000, EDTA, DMSO, cloruro de cesio, acetato de sodio, acetato de potasio, fosfatos de potasio, cloroformo, etanol, metanol, alcohol isoamílico, IPTG, X-gal, fitohormonas, reactivos para ensayo de actividad GUS, etc)			20.000.000
Medios de cultivo para plantas y bacterias (Medio MS, micronutrientes, Terrific Broth, LB broth, LB-agar, antibióticos, etc)			6.000.000
Material plástico desechable (tubos Falcon, tubos microcentrífuga, puntas de micropipetas con y sin filtro para aerosol, pipetas desechables, unidades de filtración estériles, etc)			8.000.000
Material de vidrio (botellas Schott, matraces, vasos pp., probetas, tubos de cultivo, etc)			2.000.000
TOTAL ESTIMADO			85.180.000

Para financiar parcialmente los gastos de operación descritos anteriormente se ha solicitado al FIA la cantidad de \$ 40.000.000 en el ítem respectivo Para cubrir la diferencia del total estimado, se consideran los recursos de contraparte aportados por la Universidad de Talca, correspondiente a \$ 50.000.000, en el período de 4 años Los productos considerados en el listado anterior están valorizados en dolares, por lo que pueden experimentar variaciones en el período de ejecución del proyecto.





16. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

16.1. Criterios y supuestos utilizados en el análisis

Indicar criterios y supuestos utilizados en el cálculo de ingresos (entradas) y costos (salidas) del proyecto

- Aun cuando este proyecto no contempla la comercialización de los genes producidos se ha estimado que la obtención de un gen por un investigador nacional debe ser comprado a un costo igual al de mercado, dado que ello permite la evaluación en términos comparativos y pedagógicos. Por lo tanto, dado que el proyecto es plenamente justificable desde la perspectiva de la utilización de un solo gen en una segunda etapa, se recomienda plenamente su implementación
- En este análisis y dada las características del proyecto no pueden considerarse ingresos dado que cualquier investigador nacional deberá recurrir a un banco de genes de un país extranjero y dada esta situación deberá cancelar el precio de mercado.
- La compra de la totalidad de los genes disponibles propuestos en banco de genes extranjero
- Valor estimado por gen US\$100.000, valor referencial \$670/US\$
- Se ha estimado una reajustabilidad de los precios de compra del orden de un 4% anual (IPC)
- Se contempló una proyección de 11 años, aún cuando el proyecto debe considerarse con un tiempo ilimitado.

	Sin proyecto	Con Proyecto
Costo	67.000.000	67.000.000 c/gen





17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. *Técnicos*

Las diversas metodología empleadas y la experiencia del equipo de investigadores en el área de la Biología Molecular de Plantas, no deberían ser motivo de riesgos técnicos para el desarrollo del proyecto. Por otro lado, todas las dependencias disponibles para dicho propósito, presentan la infraestructura necesaria para enfrentar la ejecución del proyecto de manera adecuada.

17.2. *Económicos*

Aumento de costos : provocado principalmente por aumento del dólar. Para realizar la investigación se requieren de reactivos altamente específicos. Todo el material de Biología Molecular utilizado en este proyecto presenta precios notablemente más altos que los usados en otras áreas de investigación y todos ellos deben ser importados desde el extranjero.

17.3. *Gestión*

Problemas en la entrega de los productos: la mayoría de los productos utilizados en Biología Molecular de Plantas deben encargarse al extranjero y en algunos casos, requieren de especial cuidado, razón por la cual ello demanda un tiempo adicional que podría afectar los plazos propuestos para el desarrollo del proyecto.

17.4. *Otros*





17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
Aumento de costos	medio	Establecer compromiso de compra con proveedores a fin de mantener valores de productos en un margen de 10%
Problemas en la entrega de los productos	medio	Establecer compromiso de compra con proveedores a fin de que mantengan en plaza los productos convenidos.





18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Se utilizarán 4 estrategias para la difusión y transferencia de resultados:

- 1.- La primera de ellas consistirá en realizar publicaciones en la Revista BIOPLANET, para lo cual su Director a comprometido como Agente Asociado una contribución en difusión y editorial equivalente a la suma de 2.400.000 pesos. De tal manera que se realizarán una publicación al comienzo y al final del Proyecto y además de dos publicaciones por año, señalando las técnicas utilizadas y los resultados parciales de ello.
- 2.- Presentación de resultados en Sociedades Científicas Nacionales que pueden ser Sociedad de Bioquímica, Sociedad de Agronomía o Sociedad de Biología de Chile.
- 3.- Publicación de artículos científicos en revistas de corriente principal.
- 4.- Durante el transcurso del último año de ejecución del Proyecto se planea realizar un Simposio Internacional, con invitación a estudiantes de últimos años de todas las escuelas de Agronomía del País, así como a estudiantes de Postgrado (Magister y Doctorado) relacionados al área de Biotecnología Vegetal. También se hará extensiva esta invitación a Profesionales del área agronómica de instituciones tales como: INIA, INDAP y SAG, y de empresas relacionadas (IANSA, MALLOA, VIVERISTAS, PIONEER, etc). En esta ocasión junto con presentar un espectro de las ventajas y oportunidades que representa la Biotecnología Vegetal para el País, se presentarán los resultados más relevantes en el mejoramiento de la resistencia a estrés abiótico de plantas cultivadas trabajadas en este proyecto. Para la realización de dicho Simposio se solicitarán fondos adicionales al FIA y a la Universidad de Talca, para costear pasajes aéreos y estadías de los investigadores invitados y costos de preparación y realización del evento. La extensión de dicho Simposio esta pensada para un máximo de tres días. Sin embargo, el tiempo de duración quedará supeditado al financiamiento del evento.





19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

(Adjuntar en Anexo B el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)

La Universidad de Talca como agente postulante es una institución de educación superior con una trayectoria tal que no debiera arrojar dudas sobre la capacidad institucional de llevar a cabo proyectos de esta naturaleza. Los investigadores a cargo, por su parte, todos con estudios de postgrado, poseen la suficiente experiencia para llevar a cabo el proyecto propuesto. La documentación probatoria se anexa a la presente propuesta

La Universidad de Talca es el producto de la fusión de la entonces Campus Talca de la Universidad de Chile y la Universidad Técnica del Estado. Desde entonces se le otorga a esta institución la calidad de Universidad por Decreto Ley N° 36, el 3 de Octubre de 1981. Es así como se desarrollan las carreras de Ingeniería Forestal y Agronomía, respaldadas por una fuerte investigación y docencia de pre y post-grado en el área de la Biología Vegetal, para lo cual se constituyó el Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología

Los académicos de la Universidad participan en la mayoría de los comités de desarrollo regional y de un sin número de proyectos realizados en conjunto con los organismos privados y gubernamentales del sector silvoagropecuario, tomando en cuenta que la región se cataloga como eminentemente agrícola. Dentro de esos organismos, se destaca la cooperación en proyectos conjuntos como INDAP y actualmente con el FIA, secretaria regional ministerial de agricultura, la intendencia regional, etc.

Algunos Proyectos manejados por Académicos de El Instituto de Biología Vegetal

Investigador principal: Dra. Ximena Calderón Baltierra

1996-1998. DIUT-UTAL. 463-07. "*Nothofagus alpina*: 1) Desarrollo de diferentes técnicas para definir marcadores bioquímicos en el proceso rizogénico 2) Estudio de variabilidad genética por RAPD".

1998-2001. BMBF. Proyecto de Cooperación Internacional con Alemania (Univ. de Goethe). "Genetic Characterization of Different *Nothofagus alpina* Ecotypes for selection of Elite Trees".

Investigador principal: Dra. María Alejandra Moya León

1996-1998. DIUT-UTAL. 316-52. "Estudio de la enzima polifenoloxidasas durante el proceso de maduración de manzanas y su rol en las reacciones de pardeamiento

1997-1999. International Foundation for Science (I.F.S.) "Ethylene biosynthesis during the ripening process of the chilean papaya fruit

1997-1999. FONDECYT 1970586. "Fisiología de maduración de pomáceas: Efecto de CO₂/O₂ sobre la producción de etileno, la actividad de las enzimas ACC oxidasa y aquellas que degradan pared celular".

Investigador principal: Prof. Elizabeth Hubert S.





1994-1996. DIUT-UTAL. “Estudio de la fenilalanina amonio liasa en manzanas durante su período de desarrollo y maduración”.

Investigador principal: Prof. Luis Meza Basso

1994-1996. CONICYT/SIDA. “Molecular Genetics and breeding for resistance and stress tolerance in potatoes “.

1994-1997. FONDECYT 1941173. “Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y optimización de la expresión de los genes codificadores de sus δ -endotoxinas”.

1998-2000. FNDR. “ Análisis y propuesta de una metodología para la tipificación de especies del género *Rhagoletis*”.

1999-2002. FONDECYT 1990899. “Actividad insecticida de bacterias modificadas del filoplano del tomate como complemento para el control de la plaga de la polilla del tomate”.

Investigador principal: Dr. Alejandro Troncoso Aguilar

1995-1998. FONDECYT 1950065. “ La flora fósil del Triásico Medio y Superior chileno entre 27° S y 30° S y su comparación con la paleofloras de paleocuecas argentinas correspondientes”.

Investigador principal: Dr. Simón Ruiz Lara

1995-1998. FONDECYT 1950650. “Aislamiento y caracterización de secuencias de DNA similares a retrotransposones LTR en el genoma de *Lycopersicon chilense*”.

1998-2001. FONDECYT 1980387. “Aislamiento y caracterización de secuencias señales reguladoras de la transcripción del retrotransposón Tom1 de *Lycopersicon chilense*”.

Investigador principal: Dr. Enrique González Villanueva

1995-1998. FONDECYT 1950633. “Determinación sexual en la planta dioica *Melandrium album*. Identificación de genes involucrados en el programa de diferenciación sexual masculino”.

Investigador principal: Dr. Raúl Herrera Faúndez

1996-1997. DIUT-UTAL. “Búsqueda de patrones genéticos en distintos cultivares de *Vitis vinifera* L”.

1996-1999. International Foundation for Science (I.F.S.) “Characterization of *Vitis vinifera* cultivars from Central Chile using PCR”.

1998-2000. DIUT-UTAL. “Estudio de diversidad genética en clones de cabernet sauvignon: caracterización de secuencias microsatelites”.

1999-2001. Programa British Council-Conicyt. “The use of DNA molecular markers to study genetic diversity in chilean native trees”.

Otro importante número de Proyectos ejecutados por otros académicos de la Universidad (Facultad de Ciencias Agropecuarias y Facultad de Ciencias Forestales) puede encontrarse en la memoria anual de la Universidad.





19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

La Universidad de Talca posee instalaciones docentes y de investigación en el Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología que garantizan el desarrollo del proyecto. Destacan entre otros, una sala completamente equipada para realizar transformación de plantas, dos cámaras de crecimiento para el cultivo “*in vitro*” de plantas y una zona de bioseguridad para el trabajo con organismos fitopatogénicos. Además, posee una zona de tratamiento y eliminación de residuos radioactivos y tratamiento e eliminación de organismos patógenos. Asimismo, cuenta con salas equipadas con espectrofotómetros, ultracentrífugas, centrífugas refrigeradas, termocicladores, etc

Como complemento a lo anterior, se cuenta con el equipamiento suficiente para hacer análisis de secuencias genómicas utilizando los diversos programas disponibles en la base de datos y una suscripción con algunas revistas de circulación internacional de impacto en el área de la Biología Molecular de plantas y Biotecnología.

2. Capacidad de gestión administrativo-contable.

La Universidad de Talca, es la institución pública de educación superior más dinámica del país. Su sostenido crecimiento en las distintas áreas y la calidad de su docencia, ha sido motivo de comentarios en seminarios internacionales sobre educación superior, y es observado y valorado por el gobierno y la comunidad nacional.

En materia de infraestructura la universidad ha experimentado un constante incremento en la superficie construida y en la disponibilidad de espacios para los alumnos: hoy cuenta con 54 mil metros cuadrados aptos para dicho fin. A lo anterior, se suma el crecimiento de la superficie del Campus Lircay, en Talca, el que hoy cuenta con más de 70 hectáreas, y la creación de un nuevo Campus en la ciudad de Curicó. Edificios, laboratorios, salas de clase y de estudio, oficinas docentes, áreas verdes y una de las más modernas bibliotecas del país. Todo lo cual es para que los alumnos (5 mil) que estudian en alguna de las 14 carreras de pregrado y de los siete postgrados (magister y doctorado) encuentren todas las posibilidades para alcanzar una formación integral y humanista.

Todo lo anterior no sería posible si la Universidad no contará con un cuerpo de profesionales de alta capacidad de gestión administrativo-contable, que se preocupan de velar porque la Universidad sea sustentable y pueda proyectarse en inversiones a mediano y largo plazo.



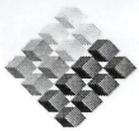


20. OBSERVACIÓN SOBRE POSIBLES EVALUADORES

(Identificar a el o los especialistas que estime inconveniente que evalúen la propuesta. Justificar)

Nombre	Institución	Cargo	Observaciones





ANEXO A

ANTECEDENTES DEL EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO





12. IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

El impacto económico del proyecto no es posible determinarlo a priori, ya que dependerá de la cantidad y la calidad de los genes aislados y caracterizados al término del proyecto. Sin embargo, basta que uno de los genes presente las propiedades buscadas, este gen por sí solo tendría un gran interés comercial. Si ahora agregáramos que con él podría generarse plantas transgénicas que permitieran aumentar la producción por ejemplo de tomate industrial, en un 10%, los valores serían elevadísimos. De tal manera, que ante los supuestos muchas ventajas económicas podría tener dicho proyecto, si los genes fuesen posteriormente utilizados en programas de mejoramiento genético de plantas de importancia agrícola.

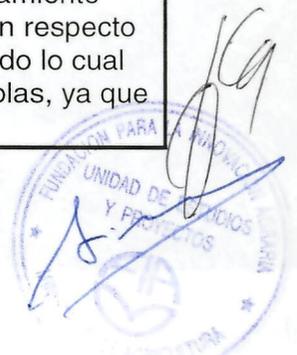
Junto a lo anterior hay que destacar que este tipo de proyectos pone también a disposición un conocimiento científico y tecnológico que facilitará la investigación de futuros proyectos en esta área de la Biotecnología Vegetal.

12.2. Social

El impacto social puede llegar a ser muy importante si se aíslan genes que pueden servir para ampliar las zonas de cultivo, a suelos degradados o salinos, o bien resistentes a sequías o a frío, ya que ello permitiría a los agricultores poder planificar sus rendimientos de manera menos desventajosa que la actual. Mejorando de esta manera la producción y sus estándares de vida. Por otra parte podría a los agricultores nacionales a un nivel de competitividad igual o superior de los países vecinos y de mayor desarrollo.

12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

La obtención de un banco de genes de utilización en programas de mejoramiento genético vía transgénesis de plantas cultivables, obligaría a cambiar la legislación respecto del cultivo y comercialización nacional de plantas genéticamente modificadas. Todo lo cual traería consigo un cambio cultural y de gestión comercial de los productos agrícolas, ya que poseerían valor agregado.



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

RUIZ		LARA	SIMON AURELIO	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
14-04-1959	sruiz@pehuenche.utalca.cl		200268	200276
FECHA NACIMIENTO	CORREO ELECTRONICO		FONO	FAX
RUT		Profesor Asociado		
		CARGO ACTUAL		
VII	Talca	2 Norte 685, Univesrsidad de Talca, Talca		
REGION	CIUDAD	DIRECCION DE TRABAJO		

ii. Formación Académica

Profesor de Estado en Biología y Ciencias	Universidad de Chile	Chile	1981
TITULOS (pregrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Doctor en Ciencias, Mención Biología Molecular	Universidad Politécnica de Cataluña	España	1993
GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca		
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Profesor Asociado		
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44		
CIUDAD Y REGION	Talca, VII Región		

iv. Trabajos Anteriores

INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA

v. Gestión de Tesis de Pregrado, Especialidades y Postgrado Número de Tesis de dirigidas:

Pre-grado: 2
Magister: 1 (co Director)
Doctorado: 1 (co Director)

vi. Gestión de Proyectos Académicos

- FONDECYT 1950650. "Aislamiento y caracterización de secuencias de DNA similares a retrotransposones LTR en el genoma de *Lycopersicon chilense*". 1995-1998.



- FONDECYT 1980387. "Aislamiento y caracterización de secuencias señales reguladoras de la transcripción del retrotransposon Tom1 de *Lycopersicon chilense*". 1998-2001.

vii. Productividad Académica

1. Olivares, C. and **Ruiz, S.** (1990). Nucleosomal organization of chromatin in sperm nuclei of the bivalve mollusc *Aulacomya ater*. *Molecular and Cell Biochem.* 101: 93 - 99
2. Sainz, J.; Prats, E.; **Ruiz, S.** and Cornudella, L. (1992). Organization of repetitive sequences in the genome of the echinoderm *Holoturia tubulosa*. *Biochimic* 74: 1067 - 1074.
3. **Ruiz-Lara, S.**, Prats E., Sainz, J. and Cornudella, L. (1992). Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA from the mollusc *Mytilus edulis*. *Gene* 117: 237 - 242
4. Carlos Olivares, María Lila Vera and **Simón Ruiz-Lara** (1993). Coexistence of two chromatin structures in sperm nucleic of the bivalve mollusc *Protothaca thaca*. *Molecular and Cell Biochem.* 125: 87 - 95.
5. **Ruiz-Lara, S.**, Prats E., M.T. Casas and Cornudella, L. (1993). Molecular cloning and sequence of a cDNA for the sperm-specific protein Ø1 from the mussel *Mytilus edulis*. *Nucleic Acids Res.* 21: 2774
6. **Ruiz-Lara, S.**, Cornudella, L. and Rodríguez-Campos, A. (1996). In vitro dissociation of DNA-protamin complex by *Xenopus laevis* nucleoplamin. *European Journal Biochemistry* 240: 186 - 194.
7. Mónica Yañez, Isabel Verdugo, Mariana Rodríguez, Salome Prat and **Simón Ruiz-Lara** (1998). Highly heterogeneous families of Ty1/copia retrotransposons in the *Lycopersicon chilense* genome. *Gene* 222: 223 - 228.
8. Gerardo Tapia, Isabel Verdugo, Mónica Yañez, Iván Ahumada, Fernando Poblete, Enrique González and **Simón Ruiz -Lara** (2001). Ethylene involvement in stress-induced expression of *TLCL1* retrotransposon from *Lycopersicon chilense*. Submitted a *Plant Journal*.



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

GONZALEZ		VILLANUEVA	ENRIQUE RAMON	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
20-09-1954	egonzale@pehuenche.otalca.cl		200291	200279
FECHA NACIMIENTO	CORREO ELECTRONICO		FONO	FAX
RUT		Profesor Asociado, Director Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca		
VII		Talca	CARGO ACTUAL	
REGION	CIUDAD	2 Norte 685, Universidad de Talca, Talca		
DIRECCION DE TRABAJO				

ii. Formación Académica

Bioquímico	Universidad de Chile	Chile	1981
TITULOS (pregrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Doctor en Ciencias Biológicas, Mención Biología Celular	Pontificia Universidad Católica de Chile	Chile	1988
GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca		
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Profesor Asociado		
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44		
CIUDAD Y REGION	Talca, VII Región		

iv. Trabajos Anteriores

INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA
Pontificia Universidad Católica de Chile	Investigador a contrata	1984	1987
Universidad de Chile	Académico Jornada Completa	1985	1988

v. Gestión de Tesis de Pregrado, Especialidades y Postgrado

vi. Gestión de Proyectos Académicos (últimos 5 años).

- Regulación de la expresión génica del sistema de restricción-modificación de *Bacillusstearothermophilus* V y su relación con el proceso de esporulación. Fondecyt 0127/91 (1991-1992). Investigador principal. Identificación de dominios funcionales en la DNA metiltransferasa MBs^tVI. DIAT-UTAL 315/17 (1994-1995). Investigador principal.



2. Determinación sexual en la planta dioica *Melandrium album*. Identificación de genes involucrados en el programa de diferenciación sexual masculino. Fondecyt 1950633 (1995-1997). Investigador principal.
3. Manejo Biotecnológico del estrés biótico y abiótico en solanaceas. 2000-2004. DIAT-Universidad de Talca. Inv. Responsable Director

vi. **Productividad Académica**

1. Venegas, A.; **Gonzalez, E.**; Bull, P. y Valenzuela, P. (1982). Isolation and structure of a yeast tRNA methionine initiator gene. *Nucleic Acids Res.* 10: 1093-1096.
2. Barra, R.; Chiong, M.; **González, E.** y Vásquez, C. (1988). A DNA modification methylase from *Bacillus stearothermophilus* V. *Biochem. J.* 255: 699-703.
3. Chiong, M.; **González, E.**; Barra, R. y Vásquez, C. (1988). Purification and biochemical characterization of tellurite-reducing activities from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* 170: 3269 - 3273.
4. Solari, A.; Venegas, J.; **González, E.** y Vásquez, C. (1991). Detection and classification of *Trypanosoma cruzi* by DNA hibridization with non-radioactive probes. *J. Protozool.* 38: 1354 - 1362.
5. Vásquez, C.; Saavedra, C. y **González, E.** (1991). Cloning the *Bst*VI restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Gene* 102: 83 - 85.
6. **González, E.** y Vásquez, C. (1993). Characterization of the *bst*VIRM genes encoding the *Bacillus stearothermophilus* V restriction- modification system. *Gene* 131: 103 - 106.
7. Padilla, C.; Alvarez, M.; Saavedra, C.; Vásquez, C. y **González, E.** (1993). Plasmidios de resistencia a antibióticos en *Shigella sonnei* y *Shigella flexnerii* y su transferencia a *Escherichia coli*. *Anal. Microbiol.* 1: 4 - 6.
8. **González, E.**; Padilla, C.; Saavedra, C. y Vásquez, C. (1994). The expression of the *bst*VIM gene from *Bacillus stearothermophilus* V is restricted to vegetative cell growth. *Microbiology* 140: 1337 - 1340.
9. Vásquez, C.; Saavedra, C.; **González, E.** y Lobos, C. (1994). Cloning and expression of the *bst*VLIM gene from *Bacillus stearothermophilus* LV in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the M_BstLVI DNA methyl-transferase. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 2: 63-68.
10. Saavedra, C. ; **González, E.** y Vásquez, C. (1998). Studies on the heterologous expression of BstVI restriction endonuclease in *Escherichia coli*. *Biochem. Molec. Biol. Intern.* 44 (2), 391-397.
11. Marcela Salazar, Cristina Theoduloz, Alejandro Vega, Fernando Poblete, Enrique González, Rubén Badilla and Luis Meza-Basso. RFLP-PCR identification of endemic Chilean species belonging to genus *Rhagoletis*. 2001 En Prensa, *Insect Molecular Biology*
12. Tapia, G., Verdugo, I., Yañez, M., Ahumada, I., Poblete, F., González, E. and Ruiz-Lara, S. Ethylene involvement in stress-induced expression of TLC1.1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense*. 2001 Enviado a *The Plant Journal*



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

VERDUGO		BASTÍAS		ISABEL ALEJANDRA	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO		NOMBRES	
25-01-1970		iverdugo@pehuenche.otalca.cl		200404 200276	
FECHA NACIMIENTO		CORREO ELECTRONICO		FONO FAX	
RUT		Asistente de Investigación			
VII		CARGO ACTUAL			
Talca		2 Norte 685, Universidad de Talca, Talca			
REGION CIUDAD		DIRECCION DE TRABAJO			

ii. Formación Académica

Biologo	Universidad de Talca	Chile	1995
TITULOS (pregrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Licenciado en Biología	Universidad de Talca	Chile	1995
GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Asistente de Investigación
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44
CIUDAD Y REGION	Talca, VII Región

iv. Trabajos Anteriores

INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA

V. Presentaciones a Congresos

- Noviembre 1996 XIX Congreso de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (XIX PABMB Congress) "Identification of sequences Homologous to Ty1- copia LTR Retrotransposons in Lycopersicon chilense".

- Noviembre 1996 XIX Congreso de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (XIX PABMB Congress). " Isolation of genes differentially expressed during the male developmental program in the dioecious plant Melendriu album".

- Noviembre 1997 XL Congreso de la Sociedad de Biología de Chile. "Retrotransposones transcripcionalmente activos en la especie de tomate Lycopersicon chilense".



- Octubre 1998 IV Congreso Nacional de Biotecnología. " Caracterización de promotores de Retrotransposones LTRs y su relación con la respuesta a estrés abiótico en tomate".

- Octubre 1998 IV Congreso Nacional de Biotecnología. " Diversidad y Organización genómica de los Retrotransposones LTRs y su correlación con la especiación en el género *Lycopersicon*".

- Noviembre 1999 XLII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile " Expresión específica de retrotransposones LTRs en *Lycopersicon* chilense inducida por herida y congelamiento".

- (Oct.- Nov. 2000) Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular. "Caractrización del Retrotransposón LTR TLC1.1 de *Lycopersicon* chilense."

- Noviembre 2000 51er Congreso Agronómico de Chile. 1er Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura. "Análisis de Polimorfismo generados por Retrotransposones LTRs en el género *Lycopersicon* y su Evaluación como Marcadores Genéticos".

- Noviembre 2000 51er Congreso Agronómico de Chile. 1er Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura. "Evaluación del Impacto Genómico de la acción de pesticidas".

- Noviembre 2000 XLIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. "Estandarización de las condiciones para los ensayos de expresión transitoria de genes quiméricos formados por fragmentos del LTR del retrotransposon TCL1 de *Lycopersicon* chilense, y el gen reportero GUS".

VI. Publicaciones :

Yañez, M. , Verdugo, I., Rodriguez, M. , Prats, S. , Ruiz-Lara, S. (1998) " High heterogeneous retrotransposons families in the *Lycopersicon* chilense genome. GENE 222: 223 – 228.

Tapia G , Verdugo I, Yañez M, Ahumada I, Poblete F, González E, Ruiz-Lara S (2001). Ethylene involvement in stress – induced expression of TLC 1.1 retrotransposon from *Lycopersicon* chilense. Submitted a Plant Journal

VII. Cursos de Perfeccionamiento y Seminarios:

1997 Perspectivas de aplicación para el desarrollo de Biotecnología Agraria Nacional. Fisiología y Biotecnología Molecular de Vegetales. 30 - 31 Octubre 1997. INIA, Carillanca - Temuco, Chile.

1997 Conferencias de investigación en Biología Vegetal. " The potential of Novel Molecular Markers Techniques RAMPO and STMS". " Engineering fungus resistance intro plants: Promoters, genes and transgenics". 9 -10 Diciembre 1997. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca. Chile.



1999 Kickoff workshop on Biotechnology. 9 - 11 Abril, 1999. Campus Lircay . Universidad de Talca. Chile.

2000 Jornadas de Actualización. Biología Molecular Aplicada a la Clínica; Cáncer, Enfermedades Cardiovasculares y Alzheimer. 28 - 29 de Abril de 2000. Campus Lircay. Universidad de Talca.

2000 Macros en Excel: 7- 29 Agosto 2000. Centro Net Work. Talca

2000 Análisis Genético Mediante Técnicas Moleculares. Curso Teórico - Práctico. 30 Octubre - 04 de Noviembre de 2000. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca.

2000 X Curso Teórico - Práctico de Detección de Virus, Viroides y Fitoplasmas. 13 - 27 de Noviembre de 2000. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentación (INIA). Madrid. España.



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

POBLETE		CASANOVA	FERNANDO ENRIQUE	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
01-08-1966	fpoblete@pehuenche.otalca.cl		200291	200276
FECHA NACIMIENTO	CORREO ELECTRONICO		FONO	FAX
RUT		Asistente de Investigación		
VII Talca		CARGO ACTUAL		
REGION	CIUDAD	2 Norte 685, Universidad de Talca, Talca		
		DIRECCION DE TRABAJO		

ii. Formación Académica

Bioquímico	Universidad Austral de Chile	Chile	1992
TITULOS (pregrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Licenciado en Bioquímica	Universidad Austral de Chile	Chile	1992
Master of Sciences	University of Nebraska	USA	1998
GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Asistente de Investigación
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44
CIUDAD Y REGION	Talca, VII Región

iv. Trabajos Anteriores

INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA
University of Nebraska	Graduate Research Assistant	1995	1998
Universidad de Talca	Investigador postgraduado	1993	1994

V. Presentaciones a Congresos

Identificación y aislamiento de genes de expresión fruto-específica González, E. ; Osorio, D., Sagredo, C y Poblete, F. Sociedad de Biología 1999



VI. Publicaciones :

Marcela Salazar, Cristina Theoduloz, Alejandro Vega, Fernando Poblete, Enrique González, Rubén Badilla and Luis Meza-Basso. RFLP-PCR identification of endemic Chilean species belonging to genus *Rhagoletis*. En Prensa, **Insect Molecular Biology**

Tapia G, Verdugo I, Yañez M, Ahumada I, Poblete F, González E, Ruiz-Lara S (2001). Ethylene involvement in stress – induced expression of TLC 1.1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense*. Submitted a **Plant Journal**

Holger Rusmann, Homayoun Shams, Fernando Poblete, Yixin Fu, Jorge E. Galán and Ruben O. Donis. Delivery of Epitopes by the Salmonella Type III Secretion for Vaccine Development. *Science* 281: 565-568, 1998.

Sáez-Vasquez, J., C. Theoduloz, F. Poblete, A. Contreras, E. Hubert and L. Meza-Basso. Chilean Potato Germplasm with Resistance to Potato viruses Y and S. *Euphytica* 69:135-140, 1993

Theoduloz, C., J Sáez-Vasquez, F. Poblete, A. Contreras, E. Hubert and L. Meza-Basso. The Incidence of Potato Viruses X, Y and S in the Chilota Potato Collection. *Am. Potato Journal* 69: 827 - 830, 1992

Cristina Theoduloz, Julio Sáez, Fernando Poblete, Elizabeth Hubert, Andrés Contreras, and Luis Meza-Basso. Técnicas de Diagnóstico y Búsqueda de Resistencia a Enfermedades Virales de Papa. *Simiente* 61:267, 1991

VII. Cursos de Perfeccionamiento y Seminarios:

Usos y manejo de vectores Invitrogen,
18 y 19 de Enero 2001-03-01
BiosChile IGSA, Santiago

Curso teórico/práctico “Análisis Genético Mediante Técnicas Moleculares”
30 de Octubre a 4 de Noviembre 2000
Universidad de Talca, Talca.

Entrenamiento en manejo de Materiales Radioactivos
Octubre 1995
48 horas de capacitación
Agencia de Protección del Medio Ambiente
Universidad de Nebraska-Lincoln, USA



Análisis de secuencias asistido por computadoras
Genetics Computer Group (GCG) Wisconsin package
5 semanas, Verano 1996
1 semestre, Agosto a Diciembre de 1997
Universidad de Nebraska-Lincoln, USA

Programa de Inglés Intensivo
Marzo – Mayo 1995
Departamento de Inglés como Segundo Idioma
Universidad de Nebraska-Lincoln, USA

Biotecnología para la Detección de Virus en Plantas,
Curso/taller Internacional
Marzo 8 – 30, 1991
Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONYCET) Universidad de
Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

DNA Recombinante, Técnicas y Aplicaciones para el Estudio de la Estructura de Genes y su
Expresión
Septiembre 3 – 14, 1990
Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

THEODULOZ		LAFUENTE	MARÍA CRISTINA	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
06 -02-1958	ctheodul@pehuenche.otalca.cl		200267	200276
FECHA NACIMIENTO	CORREO ELECTRONICO		FONO	FAX
RUT		Asistente de Investigación		
VII Talca		CARGO ACTUAL		
REGION CIUDAD		2 Norte 685, Universidad de Talca, Talca		
		DIRECCION DE TRABAJO		

ii. Formación Académica

Biologo	Universidad de Concepción	Chile	1981
TITULOS (pregrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Licenciado en Biología	Universidad de Concepción	Chile	1981
GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca		
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Planta Profesional		
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44		
CIUDAD Y REGION	Talca, VII Región		

iv. Trabajos Anteriores

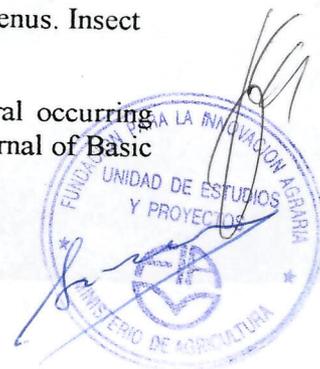
INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA

VI. Publicaciones :

Theoduloz, C., Román, P., Bravo, J., Padilla, C. Vásquez, C. y L. Meza-Basso (1997) Relative toxicity of native Chilean *Bacillus thuringiensis* strains against *Scrobipalpuloides absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Appl. Microbiol.* 82: 462-468 (1997).

Salazar, M., Theoduloz, C., Vega, A. Poblete, F., González, E., Badilla, R. and Meza-Basso, L (2001) RFLP PCR identification of endemic Chilean species belonging to *Rhagoletis* genus. *Insect Mol. Biol.* (en edición)

Theoduloz, C., Padilla, C., Salazar, M., González E. and Luis Meza-Basso*. Natural occurring *Bacillus* species on the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Basic Microbiology* (enviado)



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

YAÑEZ		CHÁVEZ	MÓNICA LORETO	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
01-02-1972	CORREO ELECTRONICO		200404	200276
FECHA NACIMIENTO			FONO	FAX
12.275.683-1	Asistente de Investigación			
RUT	CARGO ACTUAL			
VII	Talca	2 Norte 685, Universidad de Talca, Talca		
REGION	CIUDAD	DIRECCION DE TRABAJO		

ii. Formación Académica

Biologo	Universidad de Talca	Chile	1995
TITULOS (pregrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Licenciado en Biología	Universidad de Talca	Chile	1995
GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca		
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Asistente de Investigación		
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44		
CIUDAD Y REGION	Talca, VII Región		

iv. Trabajos Anteriores

INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA

V. Presentaciones a Congresos

- Noviembre 1996 XIX Congreso de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (XIX PABMB Congress) "Identification of sequences Homologous to Ty1- copia LTR Retrotransposons in *Lycopersicon chilense*".

- Noviembre 1996 XIX Congreso de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (XIX PABMB Congress). " Isolation of genes differentially expressed during the male developmental program in the dioecious plant *Melendrium album*".

- Noviembre 1997 XL Congreso de la Sociedad de Biología de Chile. "Retrotransposones transcripcionalmente activos en la especie de tomate *Lycopersicon chilense*".



- Octubre 1998 IV Congreso Nacional de Biotecnología. " Caracterización de promotores de Retrotransposones LTRs y su relación con la respuesta a estrés abiótico en tomate".

- Octubre 1998 IV Congreso Nacional de Biotecnología. " Diversidad y Organización genómica de los Retrotransposones LTRs y su correlación con la especiación en el género *Lycopersicon*".

- Noviembre 1999 XLII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile " Expresión específica de retrotransposones LTRs en *Lycopersicon* chilense inducida por herida y congelamiento".

- (Oct.- Nov. 2000) Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular. "Caractrización del Retrotransposón LTR TLC1.1 de *Lycopersicon* chilense."

- Noviembre 2000 51er Congreso Agronómico de Chile. 1er Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura. "Análisis de Polimorfismo generados por Retrotransposones LTRs en el género *Lycopersicon* y su Evaluación como Marcadores Genéticos".

- Noviembre 2000 51er Congreso Agronómico de Chile. 1er Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura. "Evaluación del Impacto Genómico de la acción de pesticidas".

- Noviembre 2000 XLIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. "Estandarización de las condiciones para los ensayos de expresión transitoria de genes quiméricos formados por fragmentos del LTR del retrotransposon TCL1 de *Lycopersicon* chilense, y el gen reportero GUS".

VI. Publicaciones :

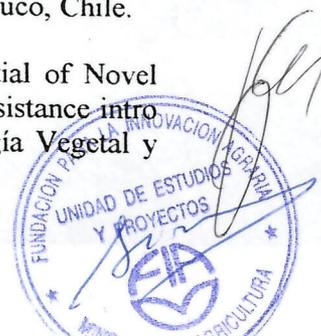
Yañez, M. , Verdugo, I., Rodriguez, M. , Prats, S. , Ruiz-Lara, S. (1998) " High heterogeneous retrotransposon families in the *Lycopersicon* chilense genome. GENE 222: 223 – 228.

Tapia G , Verdugo I, Yañez M, Ahumada I, Poblete F, González E, Ruiz-Lara S (2001). Ethylene involvement in stress – induced expression of TLC 1.1 retrotransposon from *Lycopersicon* chilense. Submitted a Plant Journal

VII. Cursos de Perfeccionamiento y Seminarios:

1997 Perspectivas de aplicación para el desarrollo de Biotecnología Agraria Nacional. Fisiología y Biotecnología Molecular de Vegetales. 30 - 31 Octubre 1997. INIA, Carillanca - Temuco, Chile.

1997 Conferencias de investigación en Biología Vegetal. " The potential of Novel Molecular Markers Techniques RAMPO and STMS". " Engineering fungus resistance into plants: Promoters, genes and transgenics". 9 -10 Diciembre 1997. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca. Chile.



1999 Kickoff workshop on Biotechnology. 9 - 11 Abril, 1999. Campus Lircay . Universidad de Talca. Chile.

2000 Jornadas de Actualización. Biología Molecular Aplicada a la Clínica; Cáncer, Enfermedades Cardiovasculares y Alzheimer. 28 - 29 de Abril de 2000. Campus Lircay. Universidad de Talca.

2000 Análisis Genético Mediante Técnicas Moleculares. Curso Teórico - Práctico. 30 Octubre - 04 de Noviembre de 2000. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca.



ACTIVIDADES DE RESPONSABILIDAD DEL PERSONAL PROFESIONAL Y ASESORES TÉCNICOS DEL PROYECTO BIOT-01-A-65.

Simón Ruiz Lara

- ◆ Coordinación de todas las actividades del Proyecto
- ◆ Presentación de informes de avance técnicos y financieros
- ◆ Elaboración de artículos de divulgación revista Bioplanet
- ◆ Adquisición de equipos
- ◆ Dirigir las construcciones de Librerías de expresión y genotecas
- ◆ Análisis e interpretación de todos los resultados obtenidos en el Proyecto
- ◆ Recolección de semillas de *L. chilense*
- ◆ Presentación a Congresos
- ◆ Dirigir la generación y evaluación de las plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* transformadas con los diversos genes seleccionados.
- ◆ Elaboración de artículos científicos en revistas de corriente principal
- ◆ Cordinación del Simposio sobre Biotecnología Vegetal como evento de divulgación del Proyecto.
- ◆ Evaluación diaria del trabajo realizado, firmando los libros foliados del proyecto, para así dar cumplimiento a normativa sobre protección de los derechos de propiedad intelectual.

Enrique González Villanueva

- ◆ Construcción de una genoteca de cDNAs correspondientes a genes expresados a temperaturas bajas
- ◆ Asesoramiento permanente al Coordinador del Proyecto en el análisis e interpretación de resultados generados en el proyecto.
- ◆ Dirigir al personal técnico en el establecimiento de las condiciones de estrés por bajas temperaturas
- ◆ Supervisión de las hibridaciones substractivas realizadas bajo las diferentes condiciones de estrés
- ◆ Supervisión en los diferentes screening realizados sobre la genoteca para el aislamiento de fagos recombinantes portadores de genes de resistencia a los distintos estrés.
- ◆ Supervisión en la generación y evaluación de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con los diversos genes seleccionados.
- ◆ Asesoramiento en la elaboración de artículos de divulgación y científicos.

Isabel Verdugo Bastías

- ◆ Cultivo y replicación de plantas silvestres de *Lycopersicon chilense*
- ◆ Establecimiento de las condiciones de estrés hídrico y estrés salino
- ◆ Construcción de la genoteca de *Lycopersicon chilense*



- ◆ Aislamiento y purificación del DNA de fagos recombinantes obtenidos desde la genoteca.
- ◆ Obtención de las plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* transformadas con genes de resistencia a estrés hídrico
- ◆ Cultivo y replicación de plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum*
- ◆ Realización de ensayos de evaluación de las plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* transformadas con genes de resistencia a estrés hídrico.
- ◆ Obtención de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con genes de resistencia a estrés hídrico y la posterior realización de los ensayos de evaluación.

Fernando PobleteCasanova

- ◆ Establecimiento de las condiciones para obtener estrés por bajas temperaturas
- ◆ Aislamiento y purificación de RNAs totales de plantas sometidas a estrés por bajas temperaturas.
- ◆ Realización de las hibridaciones substractivas entre plantas controles y plantas sometidas a estrés por bajas temperaturas.
- ◆ Aislamiento y purificación del DNA de los fagos recombinantes obtenidos en la librería de cDNA realizada con mRNAs obtenidos por estrés por bajas temperaturas.
- ◆ Realización de los análisis bioinformáticos comparativos de todos los cDNAs secuenciados en este proyecto con los ingresados en bancos de datos internacionales.
- ◆ Ingreso de secuencias de cDNAs y genes obtenidos en transcurso del proyecto en los bancos de datos internacionales.
- ◆ Obtención de las construcciones químicas utilizadas para transformar plantas de *Lycopersicon esculentum* y *Arabidopsis thaliana* con genes de resistencia a bajas temperatura.

Cristina Theoduloz LaFuente

- ◆ Mantención y replicación de plantas silvestres y transgénicas de *Arabidopsis thaliana*
- ◆ Obtención de plantas transgénicas controles de *Lycopersicon esculentum* y *Arabidopsis thaliana* transformadas con el vector pBI221.
- ◆ Evaluación de las plantas transgénicas controles mediante análisis fluorimétricos y tinción histoquímica.
- ◆ Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con genes de resistencia a estrés hídrico, salino y por bajas temperaturas.
- ◆ Evaluación de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con genes de resistencia a estrés hídrico, salino y por bajas temperaturas.



Mónica Yañez Chavez

- ◆ Preparación de todos los medios de cultivo tanto para plantas como bacterianas
- ◆ Aislamiento y purificación de RNAs totales de plantas sometidas a estrés hídrico y salinos
- ◆ Construcción de la librería de expresión en plantas controles y sometidas a estrés hídrico y salino
- ◆ Realización de las hibridaciones substractivas entre los cDNAs obtenidas desde las plantas controles y los obtenidos de las plantas sometidas a estrés hídrico y salino
- ◆ Aislamiento y purificación del DNA de los fagos recombinantes positivos obtenidos de la substracción.
- ◆ Obtención y realización de ensayos de evaluación de la calidad y cantidad de todos los DNAs que serán enviados a secuenciar.
- ◆ Screening de la genoteca de *Lycopersicon chilense* para aislar los genes de resistencia a estrés hídrico y salino utilizando como sondas los cDNAs seleccionados
- ◆ Marcaje radioactivo de las diferentes sondas utilizadas en el proyecto para realizar hibridaciones en placa e hibridaciones Southern.
- ◆ Obtención de las construcciones quiméricas utilizadas para transformar plantas de *Lycopersicon esculentum* y *Arabidopsis thaliana* con genes de resistencia a estrés hídrico y salino.
- ◆ Evaluación mediante PCR de todas las construcciones quiméricas utilizadas en el Proyecto.
- ◆ Obtención de plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* transformadas con genes de resistencia de estrés salino y por bajas temperaturas.
- ◆ Realización de ensayos de evaluación de plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* transformadas con genes de resistencia de estrés salino y por bajas temperaturas.

