



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

INFORME TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	02 JUN. 2006 10:35
Hora	10:35
Nº Ingreso	2690

Fecha de entrega del Informe

23 de mayo 2006

Nombre del coordinador de la ejecución

Gabriela Verdugo

Firma del Coordinador de la Ejecución

Gabriela Verdugo R

1. ANTECEDENTES GENERALES DE LA PROPUESTA

Nombre de la propuesta

Conocimientos prácticos de genética molecular aplicado a orquídeas chilenas

Código

FIA-FP_V-2005-1-A-094

BID-FP-V-2005-1-A-094

Postulante o Postulantes

Mauricio Alejandro Cisternas Báez

Entidad Patrocinante o Responsable

Pontificia universidad Católica de Valparaíso

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad)

México, Ciudad de México (distrito federal).

Tipo o Modalidad de Formación (curso, pasantía, otros)

Pasantía

Fecha de realización (Inicio y término)

21 enero al 18 de marzo del 2006



2. ALCANCES Y LOGROS DE LA PROPUESTA

Justificación y objetivos planteados inicialmente en la propuesta

Chile se considera como uno de los países de mayor riqueza de germoplasma nativo de plantas bulbosas con potencial ornamental (De Hertogh and Le Nard, 1993). La mayoría de estas plantas pertenecen a grupos taxonómicamente complejos, de difícil identificación con técnicas convencionales. Sin embargo, es importante identificar, coleccionar y desarrollar manejos agronómicos de estas especies, para programas de mejoramiento genético.

Si se considera que el mercado de las flores es un mercado de novedades y que se encuentra abierto a nuevas especies y variedades. Esta disponibilidad indica que es factible para el país la explotación racional con fines comerciales de su flora nativa, compuesta por especies únicas en el mundo. La riqueza de la flora nativa chilena ha sido sometida a una explotación muy intensa y poco racional, sin que haya existido, históricamente, directrices adecuadas de manejo sustentable, que contemplaran el estudio y la protección de la flora nativa del país, concebida como patrimonio genético y, por lo tanto, como fuente de posibles usos económicos y comerciales.

El género *Chloraea* Lindley, es un grupo de orquídeas chilenas que posee un gran potencial para obtener variedades comerciales, debido a la gran belleza de sus flores y a la inmensa variabilidad fenotípica encontrada en los diferentes taxa, lo que complica su identificación taxonómica (Novoa et al., 2004), pero representa una alta probabilidad de obtener resultados exitosos si se lleva a cabo un programa de mejoramiento genético.

Actualmente esta en ejecución el proyecto "Mejoramiento genético de orquídeas chilenas del género *Chloraea*" (Proyecto FIA PI-C-2003-1-A-081) que pretende desarrollar nuevas variedades para su uso comercial como flor de corte y planta en macetas, a partir del desarrollo de híbridos interespecíficos, selección de individuos elite, y modificación genética por medio de técnica biotecnológicas, lo que permitirá a mediano plazo patentar y registrar nuevas variedades para el desarrollo económico de la floricultura nacional. Además, recientemente entró en ejecución el proyecto "Examinación y circunscripción de las especies de *Chloraea* e híbridos naturales presentes en Chile: evidencias morfológicas, moleculares y citológicas (Proyecto semilla PUCV-UCONC), con el cual se pretende dilucidar y delimitar las taxa del género *Chloraea*, principalmente mediante la secuenciación de ADN ribosomal nuclear (region ITS).

En Chile, actualmente no existen especialistas en taxonomía y sistemática vegetal, que trabajen en la familia Orchidaceae.

El entendimiento y aplicación de estas técnicas permitirá a futuro, aplicarse a otros programas de mejoramiento genético de neófitas nativas, tales como *Leucocoryne*, *Placea*, *Rhodophiala*, etc. Especies que presentan una situación taxonómica similar



a las orquídeas chilenas.

Objetivos alcanzados tras la realización de la propuesta

Objetivo general

Aprender la técnica de secuenciación de ADN, guiada por un especialista en análisis molecular de orquídeas.

Objetivos específicos

1-Secuenciar la región ITS del ADN ribosomal nuclear de 30 especies del género *Chloraea*.

2-Determinar cercanía genética de diversas accesiones del banco de germoplasma.

3-Aportar nuevos antecedentes al programa de mejoramientos genéticos

Resultados e impactos esperados inicialmente en la propuesta

Conocimiento de actuales técnicas moleculares aplicable a orquídeas chilenas:

La aplicación de secuencias de ADN ribosomal nuclear, permitirá una aproximación inicial de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Chloraea*, y su relación con otros géneros cercanos. Estas técnicas podrán ser aplicadas a otras especie vegetales, que presenten similares problemas taxonómicos a nivel de especie y que son consideradas con potencial ornamental, tales como *Leucocoryne*, *Placea*, *Zephyra*, *Rodophiala*, etc.

Protección y conservación del patrimonio filogenético.

En este ámbito se requieren dos decisiones claves: ¿Qué conservar? Y ¿Cómo conservarlo?, para esto, el papel de la taxonomía se hace relevante, ya que no es posible saber si un taxón es común o escaso, amenazado o no, al menos que pueda ser definido, reconocido y correctamente identificado. El 34% de las especies de orquídeas que crecen en Chile, son endémicas. Por lo cual es prioritario definir los estados de conservación de nuestras orquídeas. Desafortunadamente, las orquídeas no fueron incluidas cuando se evaluó el estado de conservación de las neófitas monocotiledóneas chilenas, debido a que este grupo es numeroso y complejo y requiere más estudio (Hoffmann, 1989).

Unos de los puntos importantes en la conservación de la diversidad biológica, se refiere a la diversidad de especies o variedad de taxones diferentes de esta categoría que se distinguen en una región. La definición se puede expresar simplemente como diferencias en el número de especie, llamada comúnmente riqueza en especies, o diferencias en las relaciones filogenéticas que relacionan las diferentes especie entre sí, llamada riqueza taxonómica.



Uso de recursos filogenéticos

La protección adecuada de los recursos filogenéticos permite la explotación racional de estos, para usos como plantas ornamentales, cultivos medicinales, industriales, biotecnológicos, etc. A través de la obtención de variedades y patentes comercializables.

Resultados alcanzados

Describir si se lograron adquirir los conocimientos, experiencias, alianzas u otros resultados que se esperaban alcanzar a través de la participación en la actividad de formación y del desarrollo de las actividades de difusión. Si hay resultados que no se alcanzaron total o parcialmente, indicar las razones que a juicio del participante explican dicha situación.

Durante la estadía en el Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la UNAM, se lograron secuenciar alrededor del 70% de las muestras, correspondiente al ADN ribosomal nuclear (región ITS). Estos resultados permiten concluir con un alto nivel de apoyo, que la actual circunscripción del género de orquídeas terrestres *Chloraea* no es monofilético, lo que indica que las diversas especies estudiadas no provienen de un ancestro común, sino evolucionaron a partir de diferentes ancestros. Por lo cual estos taxones como entidades sistemática no están correctamente definidos (fig. 1).

A la luz de estos resultados moleculares, y con el apoyo de posteriores estudio morfológico, se hace necesario redefinir y delimitar el género *Chloraea*, y crear a lo menos dos géneros nuevos para la inclusión de las especies Argentinas de *Chloraea*, correspondiente al sector oriente de distribución (Bnos. Aires), y a las especies Chileno-Patagónicas, correspondiente a *C. cylindrostachya*, y eventualmente a *C. leptopetala*. También se debe definir a *Chloraea chica*, como género monotípico cercano al género *Gavilea* ó incluirla como especie basal dentro de este último género.

Además, se puede concluir que los actuales tratamientos taxonómicos para este género, no reflejan las relaciones filogenéticas de este grupo de plantas, basadas en datos moleculares.

También el presente estudio permitió corroborar la separación de dos taxones, presentes en el banco de germoplasma de orquídeas chilenas (ubicados en la Facultad de Agronomía de la UCV en Quillota y en el Fundo Ríos Los Yahuilos en Yumbel), que anteriormente fueron sinonimizado como *Chloraea virescens*, y que en estudios preliminares Novoa, Espejo y Cisternas (2004), definen a ambas especies como diferentes (*C. virescens* y *C. incisa*).

Las muestras restantes no pudieron ser secuenciadas debido a una alta contaminación por



hongos y/o ADN foráneo del ADN total, en el proceso de extracción, llevado a cabo en el laboratorio de genética de la Escuela de Agronomía de la UCV.

Posterior probability tree

Majority rule

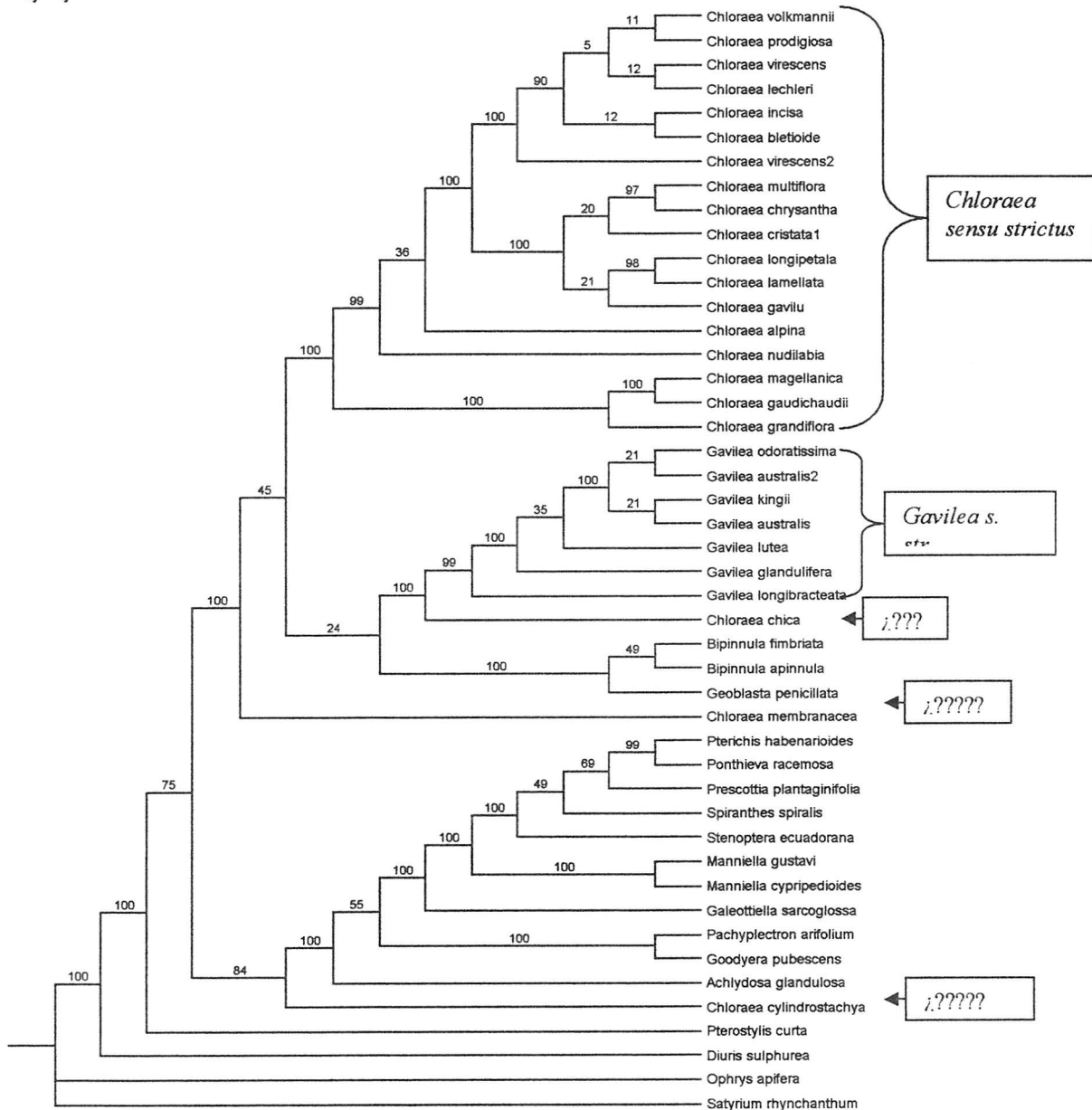


Fig. 1: Árbol de probabilidad posterior (Análisis Bayesiano)



Aplicabilidad

Explicar la situación actual del rubro y/o temática en Chile (región), compararla con las tendencias y perspectivas en el país (región) visitado o donde se ha desarrollado la actividad y explicar la posible incorporación de los conocimientos adquiridos, en el corto, mediano o largo plazo, los procesos de adaptación necesarios, las zonas potenciales y los apoyos tanto técnicos como financieros necesarios para hacer posible su incorporación en nuestro país (región). Para ello se debe tener presente la realidad en la cual se desenvuelven los participantes.

En Chile el desarrollo de la Sistemática Molecular como ciencia ha tenido un lento crecimiento, debido principalmente a la falta de especialistas en el tema. Los escasos estudios con herramientas moleculares, específicamente con secuencias génicas, datan del año 2000 en adelante. Sin embargo a la fecha no existe ningún trabajo publicado en revistas indexadas que se refieran al uso de secuencias génicas con fines taxonómicos aplicados a plantas chilenas. Eventualmente sólo existen un par de tesis de Doctorado que hacen uso de estas herramientas en especies de alto valor ornamental como son *Alstroemeria*, *Schizanthus* y *Tropaeolum*. Todas ellas desarrolladas en Santiago.

En México existen diversas Universidades que ofrecen estudios biológicos que incorporan la Sistemática Molecular como una poderosa herramienta con fines taxonómicos. Este avance en la ciencia ha sido impulsado por la inversión del país en el desarrollo de profesionales para cursar estudio de postgrado, especialmente de doctorados y postdoctorados, en las principales Universidades de Estados Unidos e Inglaterra, donde esta ciencia comenzó su desarrollo a mediados de la década de los años noventa.

Actualmente el Instituto de Biología de la UNAM lidera en México los estudios moleculares en diversas especies biológicas tales como cocodrilos, salamandras, aves, insectos y diversas especies de plantas, muchas de ellas de interés económico como son los agaves y las orquídeas.

La aplicación de estas herramientas moleculares en Chile está restringida a las Instituciones privadas o públicas que dispongan de la infraestructura necesaria y profesionales capacitados para el desarrollo de esta. No obstante es necesario la apertura de fuentes de financiamiento para el desarrollo de esta área biotecnológica.



Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar

Señalar aquellas iniciativas que surgen como días para realizar un aporte futuro para el rubro y/o temática en el marco de los objetivos iniciales de la propuesta, como por ejemplo la posibilidad de realizar nuevas actividades.

Indicar además, en función de los resultados obtenidos, los aspectos y vacíos tecnológicos que aún quedan por abordar para ampliar el desarrollo del rubro y/o temática.

Queda pendiente verificar la utilidad de esta herramienta molecular para la detección de híbridos naturales, artificiales y/o eventos de poliploidía, ya sea mediante el uso de secuencias génicas como también integrado a técnica de PCR-RFLP que permiten visualizar patrones polimórficos para detectar a parentales y progenie. Estas técnicas son de gran utilidad de programa de mejoramiento genético.

En el corto plazo estas técnicas podrían ser aplicadas a diferentes proyectos que desarrollan investigadores de la Facultad de Agronomía de la PUCV en diversas especies nativas tales como: glandularia, fabiana y Leucocoryne.



3. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA ORGANIZACIÓN Y EJECUCIÓN DE LA PROPUESTA

Programa de actividades

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar	
23/01/06	Amplificación de ADN	Secuenciación de la región ITS	Depto UNAM	Botánica
30/01/06	Purificación del ADN	Secuenciación de la región ITS	Depto UNAM	Botánica
06/02/06	Secuenciación del ADN, edición y alineamiento de las secuencias.	Secuenciación de la región ITS	Depto UNAM	Botánica
20/02/06	Análisis de los datos moleculares.	Secuenciación de la región ITS	Depto UNAM	Botánica
27/02/06	Preparación de manuscrito sobre filogenia.	Secuenciación de la región ITS	Depto UNAM	Botánica
13/03/06	Entrega del informe final del proyecto	Secuenciación de la región ITS	Depto UNAM	Botánica

Al comparar las actividades programadas en la propuesta aprobada con las actividades que realmente se realizaron, cuando corresponda, señalar las razones por las cuales algunas de las actividades programadas no se realizaron como estaba previsto o se modificaron.

Incorporar en este punto fotografías relevantes que contribuyan a describir las actividades realizadas.



Contactos Establecidos

Presentar los antecedentes de los contactos establecidos durante el desarrollo de la propuesta (profesionales, investigadores, empresas, etc.), de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/ Empresa/Organi- zación	Persona de Contacto	Cargo	Fono/Fax	Dirección	E-mail
Instituto de Biología, UNAM, Mexico	Gerardo Salazar Chavez	Jefe del herbario Nacional, Investigador del Depto de Botánica	44- 55/5622- 9095//44- 55/5550- 1760		gasc@se rvidor.un am.mx
Instituto de Biología, UNAM, Mexico	Laura Márquez	Jefe del Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Biología			

Material Recopilado

Junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Artículo		
Foto		
Libro	FOTOCOPIA DE LIBROS	Genera Orchidacearum II Adaptative radiation in Plant
Diapositiva		



CD

4. PROGRAMA DE DIFUSIÓN EJECUTADO

Programa de difusión ejecutado

En esta sección se deberán describir detalladamente las actividades de difusión realizadas, tales como publicaciones, charlas, seminarios u otras actividades similares, comparando con el programa establecido inicialmente en la propuesta. Se deberá también describir y adjuntar el material de difusión preparado y/o distribuido en dichas actividades.

La información a entregar sobre cada actividad de difusión es la siguiente:

- ◆ Tipo de actividad realizada y objetivo principal (incluye elaboración de publicaciones)
- ◆ Fecha y lugar de realización
- ◆ Temas tratados o exposiciones realizadas
- ◆ Destinatarios de la actividad: especificar el tipo y número de personas que asistieron a la actividad (productores, académicos, investigadores, profesionales, técnicos, etc.). Se deberá adjuntar el listado de asistentes según formato indicado más adelante.
- ◆ Nombre y tipo de las organizaciones u otras instituciones relevantes en el tema o sector que tuvieron representación en la asistencia al evento.
- ◆ Identificación de los expositores que estuvieron a cargo de las presentaciones, indicando su vinculación con la iniciativa y lugar de trabajo
- ◆ Indicar si se trató de una actividad abierta a todos los interesados, abierta a quienes se inscribieron previamente, o limitada a quienes fueron específicamente invitados.
- ◆ En el caso de los seminarios, deberá adjuntarse el Programa de la actividad que se realizó.

Material entregado en las actividades de difusión

Entregar un listado del material elaborado y distribuido con motivo de la actividad o material audiovisual exhibido como video, datashow, entre otros.

Además, se debe entregar adjunto al informe un set de todo el material entregado en las actividades de difusión (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación.

También se deben adjuntar fotografías correspondientes a la actividad desarrollada. El material se debe adjuntar en forma impresa y en un medio magnético (disquet o disco compacto).

Tipo de material	Nombre o identificación	Preparado por	Cantidad
Datashow	Uso de secuencias de ADN Ribosomal Nuclear para estudios taxonómicos de	Mauricio Cisternas B.	1



	orquídeas		

Participantes en actividades de difusión

Es necesario registrar los antecedentes de todos los asistentes que participaron en las actividades de difusión. El listado de asistentes a cualquier actividad deberá al menos contener la siguiente información:

Nombre	Institución	Rubro	Correo electrónico
María Alejandra Biggi	BiggiFlora Ltda	Producción de flores	biggiflora@123.cl
Loreto Araneda F.	U. Católica de Valpo	Investigación-flora nativa	loretoaraneda@yahoo.com
Alvaro González C.	U. Católica de Valpo	Profesor Liceo Agrícola de Quillota	alvagoca@gmail.com
Christian Stage M.	U. Católica de Valpo	Estudiante de genética	christianstange@gmail.com
Carolina Torres B.	U. Católica de Valpo	Estudiante de genética	Pirita16@hotmail.com
Jazmín Uribe	U. Católica de Valpo	Estudiante de genética	jazzuribe@hotmail.com
Patricio torres S.	U. Católica de Valpo	Estudiante de Agronomía	Pato_t83@hotmail.com
Violeta Mauno	U. de Chile	Tesista de Agronomía	voleta@gmail.com
Danilo Aros O.	U. de Chile	Investigación-Agronomía	daros@uchile.cl
Jessica Tapia	U. Católica de Valpo	Estudiante de Agronomía	jatitogreen@hotmail.com
Ninoska Delgado	U. Católica de Valpo	Bioquímica	ninoskadelgado@vtr.net
Cecilia Farías	U. Católica de Valpo	Tesista de Agronomía	fariascecilia@hotmail.com
Leonel Alvarez	U. Católica de Valpo	Estudiante de Agronomía	nahuelleonel@hotmail.com
Gabriela Verdugo R.	U. Católica de Valpo	Profesor de Floricultura	gverdugo@ucv.cl



Evaluación de las actividades de difusión

Especificar el grado de éxito de las actividades propuestas, señalando las razones de los problemas presentados y sugerencias para mejorarlos en el futuro. Señalar también las razones por las cuales se hicieron modificaciones al programa propuesto inicialmente, en los casos que corresponda.

5. EVALUACIÓN DE LA PROPUESTA

Organización durante la actividad (indicar con cruces)¹

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino según lo programado	X		
Cumplimiento de reserva en hoteles		X	
Cumplimiento del programa y horarios según lo establecido por la entidad organizadora	X		
Facilidad en el acceso al transporte	X		
Estimación de los costos programados para toda la actividad	X		

Evaluación de la actividad de formación

En esta sección se debe evaluar la actividad en relación a los siguientes aspectos:

a) Efectividad de la convocatoria

BUENA

b) Grado de participación de los asistentes (interés, nivel de consultas, dudas, etc)

BUENA

c) Nivel de conocimientos adquiridos en función de lo esperado (se debe indicar si la actividad contaba con algún mecanismo para medir este punto)

EXCELENTE

d) Calidad de material recibido durante la actividad de formación

EXCELENTE

¹ En caso de existir un ítem Malo o Regular, señalar los problemas enfrentados durante el desarrollo de la actividad de formación, la forma como fueron abordados y las sugerencias que puedan aportar a mejorar.



e) Nivel de adecuación y facilidad de acceso a infraestructura/equipamiento necesario para el logro de los objetivos de la actividad de formación.

EXCELENTE

f) Indique las materias que fueron más interesantes, más desarrolladas a lo largo de la actividad de formación y las que generan mayor interés desde el punto de vista de la realidad en la cual se desenvuelve el participante.

APLICACIÓN DE SECUENCIAS GÉNICAS EN EL ÁMBITO DE LA SISTEMÁTICA,
BIOGEOGRAFÍA Y CONSERVACIÓN

g) Problemas presentados y sugerencias para mejorarlos en el futuro

Aspectos relacionados con la postulación al programa de formación o promoción

a) Apoyo de la Entidad Patrocinante (cuando corresponda)

☒ bueno ☐ regular ☐ malo

Justificar:

b) Información recibida por parte de FIA para realizar la postulación

☒ amplia y detallada ☐ aceptable ☐ deficiente

Justificar:

c) Sistema de postulación al Programa de Formación o Promoción (según corresponda)

☒ adecuado ☐ aceptable ☐ deficiente

Justificar:



d) Apoyo de FIA en la realización de los trámites de viaje (pasajes, seguros, otros) (sólo cuando corresponda)

☒ bueno

☐ regular

☐ malo

Justificar:

e) Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

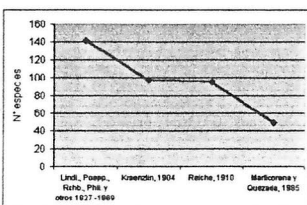
Uso de secuencias de ADN Ribosomal Nuclear para estudios taxonómicos de orquídeas chilenas

Mauricio Cisternas Báez
Escuela de Agronomía
Universidad Católica de Valparaíso

- Orchidaceae: Alrededor de 25000 sp.
- Distribuida en todo el mundo, excepto los polos.
- Mayor riqueza de especies se encuentra en las zonas tropicales (e.g. Costa Rica y Ecuador).

• Chile 7 géneros:

- Aa (1)
- Brachysteles (1-2?)
- Habenaria(1)
- Codonorchis (1)
- Bipinnula (5)
- Chloraea (~29?)
- Gavilea (~12?)



Fuente Novoa, Espejo y Cisternas, 2004

~50 sp.

Actualmente ??? taxa



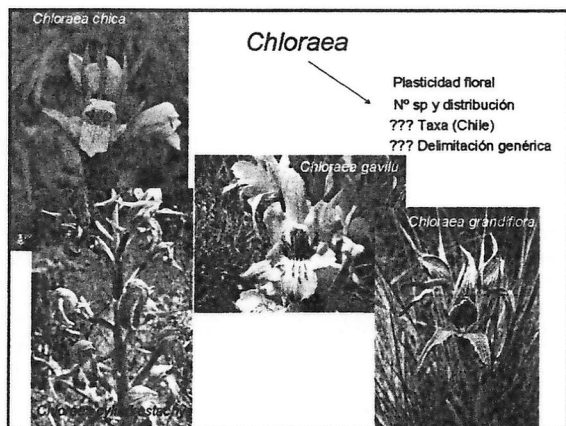
Bipinnula timbajata



Chloraea crispata



Gavilea longilabellata

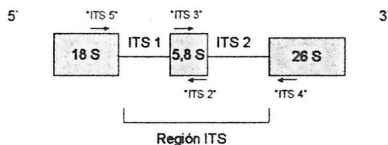


Objetivos

- Corroborar la monofilia de *Chloraea* que incluye la mayoría de los taxa presente en Chile, mediante el uso de secuencias de ADNrn (región ITS).
- Estimar las relaciones filogenéticas de *Chloraea* y géneros afines.

Métodos

1. Extracción de ADN: fresco/silica/herbario
2. Amplificación de ADN: región ITS (Internal Transcribed Spacer)



- Fácil de amplificar "usa primers universales"
- Familias multigénicas en plantas.
- Variable y ampliamente usada para reconstrucción filogenética.
- 1993-2003: 66% estudios a nivel genérico/específico
- Herencia biparental
- Variación → Recombinación
Hibridación/Poliploidía

3. Purificación de productos de amplificación.

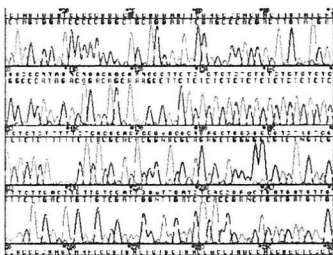
4. Reacción de secuenciación: corresponde a una 2ª amplificación lineal, mediante el método de sanger ó enzimático.
- Dntp's están marcados.
 - Cadenas simples de distintos tamaños con terminación 5'
 - Secuenciación máximo 800 b.
 - Cada reacción/1 primers.



Posteriormente la reacción de secuenciación.

↓

Secuenciador automático (cromatograma)



5. Alineamiento y ensamblaje de las secuencias: Sequencer 4.1 (automático y posteriormente manual)

- Comparación con secuencias bajadas de GenBank <http://www.ncbi.nih.gov/>
- Siempre es necesario realizar un Blast <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>

Ingresa la matriz de datos al programa PAUP 4.0 (Swofford, 2001) para análisis filogenético.

6. Análisis filogenético

- Se realizó mediante análisis de máxima parsimonia.
- Se realizó una estimación de la variabilidad filogenética a través de análisis de Bootstrap.

Sistemática filogenética ó Cladística

Estudia la diversidad de los organismos por medio de las relaciones genealógicas.

Las que se reflejan en la clasificación natural de estos. (grupos naturales)

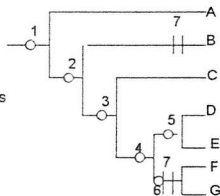
- Existen grupos:

Monofilético

Todos los descendientes de un ancestro común

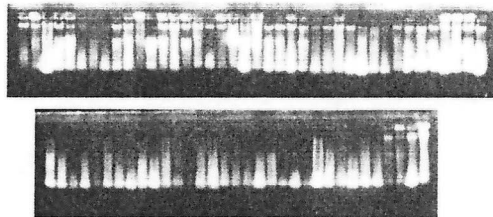
Polifilético

Incluye descendientes de ancestros Distintos (BFG, paralelismo 7)

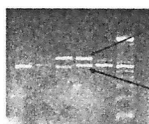
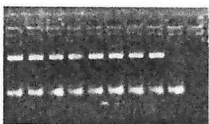


RESULTADOS

Extracción de ADN

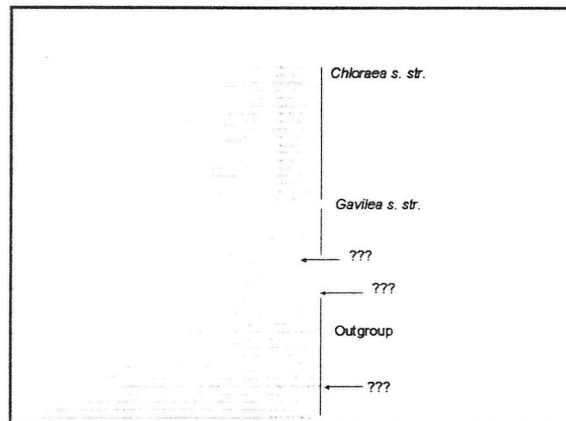


- Amplificación y purificación:



Orquideas ó tomates (700 pb)

Contaminación por hongos (560 pb)



NOMBRE	INSTITUCIÓN	E-MAIL	FIRMA
MARIA ALEXANDRA BIGGI	BIGGI FLORALTA	BIGGI FLORA @ 123.CC	<i>[Signature]</i>
Loreto Aravena	UCV	loretocaravena@yahoo.com	<i>[Signature]</i>
ALVARO GONZÁLEZ CASTRO	UCV	alvagoca@gmail.com	<i>[Signature]</i>
CHRISTIAN STANGE MARCUS	UCV	CHRISTIAN STANGE @ GMAIL.COM	<i>[Signature]</i>
Cardina Torres B	UCV	pirita 16 @ hotmail.com	<i>[Signature]</i>
Jazmin Uribe	UCV	jazzuribe@hotmail.com	<i>[Signature]</i>
Patricio TORRES S	UCV	pato_t83@hotmail.com	<i>[Signature]</i>
Violeta Mouma	U de Chile	Voleta@gmail.com	<i>[Signature]</i>
DANILO AROS O.	U. DE Chile	DAROS @ UCHILE.CL	<i>[Signature]</i>
Lessica Tapia	UCV.	JATITOGREEN @ hot mail. com	<i>[Signature]</i>
NINOSKA DELGADO	PUCV	NINOSKA DELGADO @ UTR.NET	<i>[Signature]</i>
Cecilia Fariño	PUCV	fariaccecilia@hotmail.com	<i>[Signature]</i>
Donal Alvarez SSO	PUCV	donal NAMVELLEONELO@hotmail	<i>[Signature]</i>