

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. HIPOTESIS</b> .....	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	<b>2</b>
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>3</b>
1. Antecedentes generales y mercados de la frutilla (fresa) en Chile .....	3
1.1 Antecedentes generales de <i>Fragaria vesca</i> .....	4
1.1.1 <i>Morfología y fisiología de Fragaria vesca.</i> .....	5
1.1.2 <i>Ciclo fisiológico.</i> .....	6
1.1.3 <i>Desarrollo y maduración del fruto.</i> .....	6
1.2. Importancia agronómica de <i>Fragaria vesca</i> .....	7
1.3. Importancia de <i>Fragaria vesca</i> como prototipo de estudio .....	7
2. Regulación de genes a través de factores de transcripción. ....	8
3. Familia de factores de transcripción MADS-box y su función. ....	8
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>12</b>
1. Material biológico .....	12
2. Sobreexpresión de los factores de transcripción en bacterias <i>E. coli</i> BL21. ....	14
2.1 Purificación del plásmido: .....	14
2.2 Clonación en vector de expresión:.....	16
2.3 Transformación de cepas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con plásmido recombinante. ....	16
2.4 Análisis de clonación y transformación mediante reacción en cadena de la polimerasa .....	17
2.5 Electroforesis de Comprobación en Geles de Agarosa. ....	17
2.6 Transformación de los vectores sobre bacterias quimio-competentes BL21. ....	18
2.7 Expresión de factores de transcripción en bacterias, utilizando un sistema inducible por .....	18
3. Purificación de los factores de transcripción. ....	19
3.1 Extracción de proteínas totales mediante sonicación en hielo. ....	19
3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida para proteínas. ....	19

3.2.1 Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	19
3.3 Purificación de proteínas .....	19
4. Ensayo de interacción de DNA - proteína mediante geles de retardo electroforético (EMSA).....	20
4.1 Preparación de DNA .....	20
4.1.1 Análisis de clonación y transformación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	21
4.1.2 Purificación de DNA desde gel de agarosa. ....	22
4.1.3 Marcaje del DNA usando Biotina .....	22
4.2 Ensayo de retardo electroforético (EMSA) .....	23
4.2.1 Condiciones para la unión DNA-proteína.....	23
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
1. Sobreexpresión de los factores de transcripción FvSEP3 y FvSEP1 en bacterias. ....	24
2. Purificación de proteínas .....	27
3. Interacción DNA-proteína mediante Geles de retardo electroforético (EMSA). ....	29
4. Marcaje del DNA mediante Biotina.....	30
5. Ensayo de retardo electroforético (EMSA) .....	31
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>37</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción y superficie de Frutilla en el mundo por país (Odepa, 2014). .....	4
Figura 2: Distribución mundial de <i>Fragaria vesca</i> según Hancock en 1999, con modificaciones del mapa de Hancock y Luby de 1993.....	5
Figura 3: Estructura primaria de proteínas tipo MADS-box. (A) MADS-box Tipo I (B) MADS-box Tipo II. Basado en la representación de Gramzow y Theissen en 2010. ....	9
Figura 4: Diagrama de flujo de materiales y métodos sobre el ensayo de interacción DNA-Proteína. ....	12
Figura 5: (A) Vector pET300/NT-GW/RAC Kinasa (utilizado como control positivo) (B) Vector de clonación pENTR/SD/D-TOPO donde se encuentran los genes que codifican los factores de transcripción FvSEP3 Y FvSEP1. (C) Vector receptor pET301/CT-DEST de los genes que codifican los factores de transcripción FvSEP3 y FvSEP1.....	15
Figura 6: Electroforesis de comprobación de las colonias con la secuencia de interés FvSEP3.....	26
Figura 7: A) Gel de poliacrilamida de SEP1, (B) gel de poliacrilamida SEP3. (1) Proteína purificada, (2) fracción no unida a la resina, (3) lavados, y (4) extracto crudo.....	29
Figura 8: Gel de agarosa al 2%.DNA de RIN, SQM y MYB.....	30
Figura 9: Eficiencia de marcaje con biotina de los oligos RIN, SQM, y MYB. DOT-BLOT con diluciones seriadas de estándar y oligos El experimento fue revelado usando quimioluminiscencia.....	31
Figura 10: EMSA de SEP1 y SEP3 con RIN, SQM y MYB, (1) DNA desnudo (2) DNA +SEP1/3, (3) DNA+Competidor+SEP1/3, (*) Complejo DNA-Proteína. (+) DNA libre.....	34

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia nucleotídica de los genes FvSEP1 y FvSEP3.....	13
Tabla 2: Cultivos iniciales utilizados en el experimento.....	14
Tabla 3: Vectores de expresión en bacterias generados en este trabajo .....	16
Tabla 4: DNA utilizados en el ensayo de interacción DNA-proteína .....	21
Tabla 5: Partidores utilizados para amplificar DNAs usados en interacción DNA-proteína .....	21
Tabla 6: Concentración de DNA plasmidial, obtenidos de la sobreexpresión.....	24
Tabla 7: Concentración de DNA plasmidial de las colonias transformadas con FvSEP3. ....	25
Tabla 8: Concentración de proteínas (ng/μL) de las muestras luego de la inducción con IPTG. ....	27
Tabla 9: Resultados de la purificación de proteínas de FvSEP1 .....	27
Tabla 10: Resultados de la purificación de proteínas de FvSEP3. ....	28
Tabla 11: Concentración de DNA purificado en ng/μL de los DNA RIN, SQM y MYB.....	30