

Índice de contenidos

Resumen	1
Abstract	3
1. Marco teórico	4
1.1 Situación del pino radiata en Chile	4
1.2 Formación de la madera de compresión	5
1.3 Respuesta gravitrópica en organismos vegetales	6
1.4 Auxina	8
1.5 Transportadores de auxina	11
1.6 Importancia del transcriptoma	13
1.7 Transcriptoma de pino radiata	16
1.8 Distribución de la fitohormona auxina en pino inclinado.	19
1.9 Regulación de la expresión de transportadores de auxina.	21
2 Hipótesis	23
3 Objetivos.....	23
3.1 General.....	23
3.2 Específicos.....	23
4 Metodología	24
4.1 Búsqueda y caracterización de transportadores de auxina en bibliotecas de RNA-seq. 24	
4.1.1 Búsqueda de transportadores de auxina en bibliotecas de RNA-seq.....	24
4.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias.....	30
4.1.3 Árbol Filogenético.....	31
4.2 Evaluación del perfil transcripcional.....	33
4.2.1 Análisis de expresión de transcritos mediante FPKM	33
4.2.2 Cuantificación por qPCR	34

4.2.3	Diseño de partidores	37
4.2.4	Extracción de ARN total.....	39
4.2.5	Síntesis de ADNc.....	41
4.2.6	Cuantificación mediante qPCR	42
4.3	Análisis estadístico.....	43
5	Resultados	45
5.1	Transportadores de auxina identificados en bibliotecas de RNA-Seq.....	45
5.2	Alineamiento múltiple de secuencias	48
5.3	Árbol filogenético y comparación de secuencias	53
5.4	Diseño de partidores para qPCR.....	54
5.5	Extracción de RNA.....	54
5.6	Gráficos de expresión de qPCR.....	57
6	Discusión.....	65
6.1	Identificación de transportadores de auxina en bibliotecas de RNA-Seq	65
6.2	Genes con expresión diferencial en la respuesta gravitrópica.....	67
7	Conclusión	70
8	BIBLIOGRAFIA	72
9	ANEXOS.....	77
9.1	Secuencias de largo completo de los transportadores de auxina identificados. ..	77
9.2	Secuencias aminoacídicas de los transportadores de auxina identificados.....	83
9.3	Numero de acceso de las proteínas utilizadas en el árbol filogenético.	86
9.4	Script en Bioperl para la obtención de las secuencias de los ID de la salida de BLAST.	87

Índice de figuras

Figura 1: Plantaciones forestales a diciembre del 2013 (Instituto Forestal Chile, 2015).....	5
Figura 2: Roles de la auxina en el crecimiento y desarrollo de plantas.	9
Figura 3: Vía para la biosíntesis de auxina en <i>A. thaliana</i>	9
Figura 4: Vía principal de degradación de auxina.....	10
Figura 5: Mecanismos de transporte de Auxina.....	13
Figura 6: Clasificación funcional de genes de pino radiata expresados diferencialmente en cada librería de respuesta gravitrópica.	18
Figura 7: Esquema que explica la interacción entre la fitohormona auxina y la expresión y acumulación de genes de biosíntesis de flavonoles en la respuesta a estrés gravitrópico.	20
Figura 8: Distribución de auxina por inmunolocalización en tejidos de tallos inclinados... ..	22
Figura 9: Experimento clásico de RNA-Seq.....	25
Figura 10: Etapas generales del algoritmo CAP3 para realizar ensamble de secuencias.	29
Figura 11: Curva de amplificación.	36
Figura 12: Curva de disociación.....	37
Figura 13: Cortes realizados de los tallos de plántulas de pino radiata. (Ramos y cols., 2012; Ramos y cols. 2012b).....	39
Figura 14: Alineamiento múltiple de secuencias de los transportadores de auxina de tipo ABCB de pino radiata y de otros organismos vegetales.....	50
Figura 15: Alineamiento múltiple de secuencias de los transportadores de auxina de tipo AUX1 de pino radiata y de otros organismos vegetales.....	51
Figura 16: Alineamiento múltiple de secuencias de los transportadores de auxina de tipo PIN de pino radiata y de otros organismos vegetales.....	52
Figura 17: Análisis filogenético de las proteínas transportadoras de auxina de pino radiata.	53
Figura 18: Gel de agarosa al 2% de las muestras tratadas con DNAsa.	56
Figura 19: Niveles de expresión relativa de PrABCBC4 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	57

Figura 20: Niveles de expresión relativa de PrABCBC4 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	58
Figura 21: Niveles de expresión relativa de PrABCBC7 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	58
Figura 22: Niveles de expresión relativa de PrABC74 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	59
Figura 23: Niveles de expresión relativa de PrAUX1C1 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	59
Figura 24: Niveles de expresión relativa de PrAUX1C1 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	60
Figura 25: Niveles de expresión relativa de PrAUX1C2 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	60
Figura 26: Niveles de expresión relativa de PrAUX1C2 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	61
Figura 27: Niveles de expresión relativa de PrAUX1C4 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	61
Figura 28: Niveles de expresión relativa de PrAUX1C4 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	62
Figura 29: Niveles de expresión relativa de PrPIN1C5 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	62
Figura 30: Niveles de expresión relativa de PrPIN1C5 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	63
Figura 31: Niveles de expresión relativa de PrPIN2C1 de las condiciones superior (Sup) e inferior (Inf).	63
Figura 32: Niveles de expresión relativa de PrPIN2C1 de las condiciones apical (A), medio (M) y basal (B).....	64

Índice de tablas

Tabla 1: Ventajas de la técnica de RNA-Seq comparadas con otros métodos de transcriptómica. Modificado de (Wang y cols., 2009b).	16
Tabla 2: Resultados obtenidos luego de la secuenciación por ILLUMINA.	18
Tabla 3: Largo y valor de FPKM de las 15 secuencias identificadas en las bibliotecas de RNA-Seq.....	46
Tabla 4: Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas de los transportadores de auxina de tipo ABCB.	47
Tabla 5: Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas de los transportadores de auxina de tipo AUX1.	47
Tabla 6: Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas de los transportadores de auxina de tipo PIN.....	47
Tabla 7: Matriz de identidad de las secuencias aminoacídicas de los transportadores de auxina de tipo ABCB.	47
Tabla 8: Matriz de identidad de las secuencias aminoacídicas de los transportadores de auxina de tipo AUX1.	48
Tabla 9: Matriz de identidad de las secuencias aminoacídicas de los transportadores de auxina de tipo PIN.....	48
Tabla 10: Secuencias con expresión diferencial y su cantidad de aminoácidos y nucleótidos.	48
Tabla 11: Partidores de qPCR diseñados a partir de las regiones 5' y 3'-UTR.....	54
Tabla 12: Extracción de ARN de las muestras y sus respectivas concentraciones.....	55
Tabla 13: Tratamiento con DNAsa de las muestras de ARN.	57