

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. HIPOTESIS.....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1 La formación de la madera.....	5
4.2 Corte transversal del tronco de un árbol.....	5
4.3 Xilogénesis.....	6
4.4 Madera de compresión y madera normal.....	7
4.5 Los genes y formación de madera.....	8
4.6 Los árboles como sujetos de estudio.....	9
4.7 Biblioteca genómica.....	9
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	15
5.1 Extracción de RNA.....	16
5.2 Purificación del RNA por DNAsa.....	18
5.3 Síntesis de cDNA.....	18
a) <i>Síntesis de la primera hebra cDNA</i>	18
b) <i>Síntesis de segunda hebra cDNA</i>	19
5.4 Hibridación Substractiva bajo condiciones de Supresión (SSH) en <i>Pinus Radiata</i>	20
ETAPA 1: DIGESTIÓN.....	21
ETAPA 2: SUBTRACCION.....	21
a) <i>Preparación de cDNA tester</i>	21
b) <i>Preparación Master Mix</i>	21
c) <i>Preparación cDNA-tester con adaptador 1 y 2</i>	22
ETAPA 3: PRIMERA HIBRIDACIÓN.....	22
ETAPA 4: SEGUNDA HIBRIDACIÓN.....	23
ETAPA 5: PRIMERA AMPLIFICACIÓN (PCR 1).....	23
ETAPA 6: SEGUNDA AMPLIFICACIÓN (PCR 2).....	24
5.5 Ligación-transformación para kit cDNA sustraction.....	24
5.6 Verificación de ligación transformación por plasmid miniprep kit.....	25

5.7	Secuenciación de fragmentos encontrados.....	26
5.8	Análisis de Northern blot.....	26
5.8.1	ELECTROFORESIS EN GEL DENATURANTE.....	26
5.8.2	TRANSFERENCIA.....	27
5.8.3	PROTOCOLO MARCAJE RADIOACTIVO.....	28
5.8.3.A	PCR SONDA PARA NORTHERN BLOT.....	28
5.8.3.B	SOLUCIÓN DE PRE-HIBRIDACIÓN (100 ml).....	29
	a) <i>Pre-Hibridación</i> :.....	29
	b) <i>Hibridación</i> :.....	29
5.8.3.C	DETECCIÓN DE LA SONDA MARCADA.....	29
6.	RESULTADOS.....	31
6.1	Resultados extracción de RNA.....	31
6.2	Resultados obtenidos SSH.....	32
6.3	Resultado de PCR de bacterias con partidor M13.....	33
6.4	Resultados de kit plasmid miniprep.....	39
6.5	Resultados de secuenciación de clones.....	41
6.6	Northern blot.....	42
7.	DISCUSIÓN.....	52
8.	CONCLUSIONES.....	56
9.	BIBLIOGRAFIA.....	57
10.	ANEXOS.....	61
	a) Clon 8 / SSH-A.....	61
	b) Clon 24/SSH-A.....	61
	c)Clon 25/SSH-A.....	62
	d)Clon 26/SSH-A.....	63
	e)Clon 27/SSH-C.....	63
	f) Clon 28/SSH-A.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestra la cantidad de plantas expuestas a los distintos tiempos del tratamiento.	15
Tabla 2. Muestra las distintas partes de la planta que se usaron para el análisis (TS: tallo superior, TI: tallo inferior, H: hoja, R: raíz) analizada a los distintos tiempos de exposición al tratamiento.....	16
Tabla 3. Protocolo de preparación del gel denaturante previo a la transferencia.....	25
Tabla 4. Resumen de los distintos fragmentos obtenidos en las distintas SSH, según peso molecular.....	32
Tabla 5. Fragmentos obtenidos por el partidor m13 y seleccionados para secuenciación, como resultado de PCR.....	38
Tabla 6. Resultado de la secuenciación de clones.....	41

INDICE DE FIGURAS

1.	Figura 1. Diagrama esquemático de las diferentes partes del xilema de un pino....	6
2.	Figura 2. Diagrama de la técnica SSH.....	11
3.	Figura 3. Diagrama inserción de una secuencia al interior de un plasmido.....	12
4.	Figura 4. Esquema de la inserción de un plasmido al interior de la bacteria.....	13
5.	Figura 5. Representación esquema de reacción de polimerasa en cadena.....	14
6.	Figura 6. Crecimiento de las plantas sobre base con 45° de inclinación.....	15
7.	Figura 7. Gel de agarosa al 1% con las 15 muestras de RNA en la primera etapa de investigación.....	31
8.	Figura 8. Gel de agarosa que señala las bandas obtenidas luego de la técnica de SSH.....	33
9.	Figura 9 a. PCR bacterias con partidor M13, en gel de agarosa.....	34
10.	Figura 9 b. PCR bacterias con partidor M13, en gel de agarosa. Muestras de bacterias de la 45 a la 59.	34
11.	Figura 9 c. PCR bacterias con partidor M13, en gel de agarosa. Muestras de bacterias de la 60 a la 65.....	35
12.	Figura 9d. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 66 a la 73.....	35
13.	Figura 9 e. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 74 a la 96.....	35
14.	Figura 9 f. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 97 a la 118.....	36
15.	Figura 9 g. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 119 a la 127.....	36
16.	Figura 9 h. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 128 a la 147.....	36
17.	Figura 9 i. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 148 a la 167.....	37
18.	Figura 9 j. PCR de bacterias con partidor M13 en gel de agarosa: muestras de bacterias de la 168 a la 188.....	37

19. Figura 10 a. PCR de miniprep de clones seleccionados de las figuras 9a, 9b, 9c, 9d.....	40
20. Figura 10 b. PCR de miniprep de clones seleccionados de las figuras 9e, 9f.....	40
21. Figura 10 c. PCR de miniprep de clones seleccionados de las figuras 6g, 6h, 6i, 9j.....	40
22. Figura 10 d. PCR de miniprep de clones seleccionados para utilizar en los últimos Northern blot.....	41
23. Figura 11. Gel denaturante con concentraciones desiguales.....	43
24. Figura 12. A: membrana obtenida luego de una transferencia por gel denaturante. B: hibridación con el clon 8 que corresponde a un fragmento de 128 pb: SSH-A: <i>Pinus taeda</i> , que representa al gen de la enzima adenosil metionina sintetasa 2 (sams-2); a los distintos tiempos. C: membrana sometida al control.....	44
25. Figura 13. Muestra de RNA en gel de agarosa al 1% solo con 7 muestras.....	45
26. Figura 14. Gel denaturante para igualar concentraciones.....	46
27. Figura 15. A: membrana obtenida luego de una transferencia por gel denaturante. B: hibridación con el clon 24 que corresponde a un fragmento de 1300 pb: SSH-A: <i>Pinus taeda</i> , que representa al gen de la proteína metionina sintetasa; a los distintos tiempos. C: membrana sometida al control.....	47
28. Figura 16. A: membrana obtenida luego de una transferencia por gel denaturante. B: hibridación con el clon 25 que corresponde a un fragmento de 1200 pb: SSH-A: <i>Pinus taeda</i> , que representa al gen de la proteína transportadora ubiquitina (señal de traducción); a los distintos tiempos. C: membrana sometida al control.....	48
29. Figura 17. A: membrana obtenida luego de una transferencia por gel denaturante. B: hibridación con el clon 26 que corresponde a un fragmento de 700 pb: SSH-A: <i>Pinus taeda</i> , que representa al gen de la proteína reguladora auxin (señal de traducción); a los distintos tiempos. C: membrana sometida al control.....	49
30. Figura 18. A: membrana obtenida luego de una transferencia por gel denaturante. B: hibridación con el clon 27 que corresponde a un fragmento de 400 pb: SSH-C: <i>Pinus taeda</i> , que representa al gen de la proteína finger zinc humana (factor de	

transcripción); a los distintos tiempos. C: membrana sometida al control.....50

31. **Figura 19.** A: membrana obtenida luego de una transferencia por gel denaturante. B: hibridación con el clon 28 que corresponde a un fragmento de 320 pb: SSH-A: *Pinus taeda*, que representa al gen de la proteína ubiquitina ligasa (señal de traducción); a los distintos tiempos. C: membrana sometida al control.....51