

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1.- INTRODUCCIÓN	10
1.1.- La importancia de <i>Pinus radiata</i> en Chile.	10
1.2.- Calidad de la madera.	10
1.3.- La importancia de la respuesta gravitrópica en organismos vegetales	11
1.4.- Expansinas	13
1.5.- Rol de expansinas en crecimiento celular	16
1.7.- Perfil transcripcional	18
1.8.- Métodos computacionales	18
1.9.- Modelamiento tridimensional de una proteína.	19
1.10.- Minimización y Equilibrio termodinámico	19
2.- HIPÓTESIS	20
3.- OBJETIVOS	21
4.- METODOLOGÍA	22
4.1.- Análisis de las bibliotecas por RNAseq	22
4.1.1.- Análisis filogenético de las secuencias de genes <i>expansinas</i> de <i>P. radiata</i>	23
4.2.- Análisis del perfil de transcripción mediante qPCR	23
4.3.- Extracción ARN.	24
4.4.- Síntesis de cDNA.	24
4.5.- PCR cuantitativo o qPCR	24
4.6.- Modelamiento comparativo	25
4.6.1.- Selección de templado	25
4.6.2.- Alineamiento de secuencias	25
4.6.3.- Construcción del modelo	26
4.6.4.- Evaluación de los modelos	26

4.7.- Minimización y equilibrio termodinámico	27
5.- RESULTADOS	28
5.1.- Identificación de expansinas en librerías de RNAseq de pino radiata.	28
5.1.1.- Alineamiento entre PrEXPA4 y Marcador de secuencia expresada identificado en librerías SSH.	29
5.2.- Largo de Secuencias obtenidas y valores FPKM.	31
5.3.-Alineamiento múltiple y análisis filogenético	33
5.3.1- Análisis filogenético de expansinas obtenidas	34
5.4.- Secuencia de partidores y productos de PCR esperados.	37
5.5.- Eficiencia de partidores	38
5.6.- Análisis de expresión génica por ensayos de qPCR	38
5.7.- Modelamiento Comparativo	43
5.7.1.- Identificación del Templado	43
5.7.2.- Alineamiento entre secuencia blanco y templado.	43
5.7.3.- Construcción del modelo comparativo.	44
5.7.4.- Evaluación de los modelos obtenidos	44
5.7.5.- Análisis del modelo obtenido.	46
5.7.6.- Minimización, equilibrio termodinámico y re-evaluación del modelo	48
6.- DISCUSIÓN.	52
6.1.- Expansinas podrían estar participando en la respuesta a gravitropismo	53
6.2.- PrEXPA4 presenta una estructura tridimensional conservada.	54
7.- CONCLUSIÓN	56
8.- FIGURAS SUPLEMENTARIAS	57
ANEXO	61
REFERENCIAS	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematización de madera de compresión vs madera normal.	11
Figura 2. Imagen microscópica de tejido inferior (Lw) y superior (Up) del tallo en plántulas de pino radiata de 1 año, inclinadas por 15 días.	12
Figura 3. Esquematización de la interacción de expansinas en la pared celular.	14
Figura 4. Esquema de la estructura proteica de las distintas familias de expansinas	15
Figura 5. Alineamiento entre PrEXPA4 y EST.	30
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de expansinas obtenidas.	33
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de expansinas obtenidas.	34
Figura 8. Análisis filogenético Expansinas de Pinus radiata y Arabidopsis thaliana.	35
Figura 9. Fotografía gel agarosa, PCR convencional para cada par de partidores.	37
Figura 10. Análisis de expresión del gen PrEXLA1 por ensayos de qPCR.	39
Figura 11. Análisis de expresión de los genes PrEXPA1 y PrEXPA2 por ensayos de qPCR.	40
Figura 12. Análisis de expresión de los genes PrEXPA3 y PrEXPA4 por ensayos de qPCR.	41
Figura 13. Análisis de expresión del gen PrEXPB1 por ensayos de qPCR.	42
Figura 14. Alineamiento entre PrEXPA4 y el templado 1N10.	44
Figura 15. Imagen de la estructura tridimensional de PrEXPA4.	47
Figura 16. Visualización del sitio activo HFD.	47
Figura 17. Gráfico de RMSD durante la trayectoria de la simulación molecular para PrEXPA4.	48
Figura 18. Gráfico de Ramachandran para PrEXPA4.	49

Figura 19. Gráficos de calidad del modelo y energía, obtenidos de ProSA. **50**

Figura 20. Gráfico de calidad de energía obtenido mediante ANOLEA. **50**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de expansinas identificadas mediante búsqueda con palabras clave.	28
Tabla 2. Expansinas identificadas mediante blast local.	29
Tabla 3. Cantidad de nucleótidos y aminoácidos de secuencias obtenidas.	31
Tabla 4. Valores FPKM para las secuencias obtenidas en librerías RNAseq.	32
Tabla 5. Secuencias de partidores para qPCR diseñados en Primer 3.	37
Tabla 6. Eficiencia de partidores para qPCR.	38
Tabla 7. Análisis de identidad de PrEXPA4.	43
Tabla 8. Valores de puntuación generados por MODELLER para PrEXPA4.	45
Tabla 9. Valores de PROCHEK y ProSA de PrEXPA4.	46
Tabla 10. Numero de expansinas descritas en otros organismos vegetales.	53