

INDICE

Índice

Resumen

Abstract

Índice

I Introducción	1
1.1 Formulación del marco teórico	2
II Formulación de hipótesis	7
III Objetivos generales y específicos	7
IV Antecedentes bibliográficos	10
4.1 Importancia del pino radiata en la actividad forestal en Chile	10
4.2 El pino radiata	12
4.2.1 Taxonomía	12
4.2.2 Descripción biológica y hábitat	12
4.3 Calidad de la madera	13
4.4 El cambium vascular	14
4.5 Diferenciación del xilema	14
4.6 La formación de madera	15
4.7 Variaciones en la formación de madera	21
4.8 Formación de la madera de reacción	22

V Capítulo I : “Identificación de genes diferencialmente expresados durante la respuesta gravitrópica por SSH”	25
5.1 Introducción	26
5.1.1 Avances en genómica de especies forestales	27
5.1.2 Secuencias de genomas	28
5.1.3 Secuencias de EST	29
5.1.4 Estudios de expresión	29
5.1.5 Respuesta gravitrópica	32
5.1.6 Planteamiento del problema	33
5.2 Materiales y métodos	34
5.2.1 Obtención de muestras	35
5.2.2 Extracción de ARN total	36
5.2.3 Construcción de las bibliotecas supresivas substractivas SSH y síntesis de ADN	36
5.2.4 Construcción de bibliotecas substractivas de ADNc	36
5.2.5 Secuenciación y análisis bioinformático	38
5.2.6 PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR)	38
5.3 Resultados	40
5.3.1 Bibliotecas SSH e identificación de genes diferencialmente expresados	41
5.3.2 Análisis de ESTs y clasificación funcional	41
5.3.3 Análisis de expresión génica por ensayos de qPCR	48

5.3.3.1 Evaluación de genes normalizadores o constitutivos	51
5.3.3.2 Análisis de genes con relación a transducción de señales hormonales y factores de transcripción	55
5.3.3.3 Análisis de genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides	62
5.3.3.4 Análisis de expresión de genes activados en respuesta a estrés, estructura celular y síntesis proteica	74
5.3.3.5 Análisis de expresión de genes candidatos en raíces y acículas de plántulas de pino radiata bajo estímulo gravitrópico	82
5.4 Discusión	87
VI Capítulo II : “Etileno en la respuesta gravitrópica”	95
6.1 Introducción	96
6.2 Materiales y métodos	101
6.2.1 Obtención de muestras	102
6.2.2 Tratamiento de plantas	102
6.2.3 Preparaciones histológicas	102
6.2.4 Extracción de ARN total	103
6.2.5 Síntesis de cADN de hebra simple	103
6.2.6 PCR convencional y clonamiento de ACOs	103
6.2.7 PCR cuantitativo (qPCR)	104
6.2.8 Extracción de proteínas totales	105

6.2.9 Ensayo de ELISA	106
6.3 Resultados	107
6.3.1 Análisis anatómico de marcadores de formación de madera de compresión	108
6.3.2 Análisis anatómicos en plántulas tratadas con etileno	111
6.3.3 Selección de los contigs codificantes para ACC oxidasas	116
6.3.4 Genes de biosíntesis de etileno son expresados diferencialmente en tallos durante la respuesta gravitrópica	119
6.3.5 Los contigs para ACC oxidasa son expresados en tejidos vegetativos	122
6.3.6 La proteína ACC oxidasa es diferencialmente expresada en tallos de plantas sujetas a inclinación	125
6.3.7 Análisis de expresión génica y su dependencia de la señal de etileno	127
6.3.7.1 Genes relacionados con transducción de señales hormonales y factores de transcripción	127
6.3.7.2 Genes relacionados con el metabolismo de fenilpropanoides	131
6.3.7.3 Análisis de expresión de genes activados en respuesta a estrés, estructura celular y síntesis proteica	137
6.3.7.4 Análisis de genes candidatos en raíces y acículas de plántulas de pino radiata bajo estímulo gravitrópico y su dependencia de la señal de etileno	141
6.4 Discusión	146
7 Conclusiones generales	150

8 Referencias bibliográficas	153
9 Anexos	169