



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *DHN2* EN
EUCALYPTUS NITENS EN RESPUESTA A LA
ACLIMATACIÓN AL FRÍO**



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

MARÍA FRANCISCA BELTRÁN GUZMÁN
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Tutor: Dra. Marta Fernández
Profesor co-Tutor: Dr. José L. Gutiérrez

RESUMEN

Las plantas de la especie *E. nitens* aumentan su tolerancia al congelamiento luego de ser expuestas a temperaturas frías no congelantes junto con una disminución de la longitud del día, en un fenómeno conocido como aclimatación a baja temperatura o endurecimiento. La acumulación de proteínas Dehidrinas (DHNs) se ha descrito como clave en este proceso, dado su rol de protección ante la disminución en el contenido de agua. El carácter inducible de estas proteínas ha sido foco de atención, dirigiendo el interés en la regulación transcripcional del gen y los genes que participan en su regulación. El objetivo del presente trabajo fue identificar TFs con elementos de unión a secuencias del promotor putativo del gen *Eni.dhn2* y que sean relevantes en la inducción temprana del gen en respuesta a la aclimatación al frío.

Para el estudio, plantas de una familia de medios hermanos de *E. nitens* caracterizada como tolerante al frío fueron expuestas a tratamientos de aclimatación. Inicialmente, las plantas se mantuvieron en una condición no aclimatada (NA) que luego de 7 días se cambió al tratamiento de aclimatación con temperatura y fotoperiodo de 8/4 °C y 10/14h, respectivamente. Se tomaron muestras justo después de disminuida la temperatura nocturna (15, 30 y 60 minutos de exposición), luego de 7 días (CABF) y luego de aplicadas 3 heladas nocturnas de -2°C (CAAF). Finalmente, la temperatura y el fotoperiodo se cambiaron a una condición de des-aclimatación (DA 12/8 °C 14/10h), en la cual se evaluó la supervivencia de las plantas. Por otro lado se analizó la secuencia disponible del promotor putativo del gen *Eni.dhn2* (776pb) en busca de elementos *cis*, utilizando la información contenida en la base de datos PlantCare. En base a los elementos *cis* encontrados y data correspondiente a genes diferencialmente expresados obtenidos de bibliotecas de RNA-seq de diferentes tratamientos de aclimatación, se seleccionaron TFs candidatos. A partir de hojas congeladas colectadas en cada punto del perfil de aclimatación se extrajo ARN y se determinó la expresión relativa de los genes codificantes para estos factores candidatos mediante la técnica de RT-qPCR. Utilizando el mismo material vegetal, se prepararon extractos nucleares y se

realizaron ensayos de unión mediante EMSA para detectar complejos proteína-ADN diferencial en relación a los tratamientos de aclimatación. Para esto se generaron sondas conteniendo un elemento *HSE* del promotor del gen *Eni.dhn2* (HSE1) o el elemento consenso *HSE* (HSEC), entre otras sondas.

Los resultados obtenidos, en el ensayo de supervivencia y determinación de TL₅₀, confirmaron la capacidad de responder al tratamiento de aclimatación simulado en condiciones de laboratorio. La expresión relativa de los genes *candidatos* *Eni.hsfa2*, *Eni.rd26*, *Eni.myb4* y *Eni.HB7* varió significativamente entre los tratamientos. Se determinó que el promotor putativo del gen *Eni.dhn2* presenta un TSS y la *TATA-box* entre las posiciones -31 a -23 pb (relativo al TSS). La búsqueda en PlantCare permitió la identificación de elementos *cis* en el promotor del gen *Eni.dhn2* relacionados a respuesta estrés o estímulos abióticos, como *ABRE*, *G-box*, *ACE*, *HSE* y *circadian*. La expresión relativa del gen *Eni.hsfa2* aumentó significativamente al comparar los tratamientos NA-CABF y alcanzó el mayor nivel en la condición CAAF. Los resultados observados en los ensayos de unión mostraron que el elemento *HSE* presente en el gen *Eni.dhn2* interacciona con una proteína presente en el extracto nuclear formando complejos de interacción proteína-ADN diferenciales al comparar extractos nucleares de diferentes condiciones. Se determinó que esta interacción es específica para dicho elementos, mediante ensayos de competencia. En su conjunto, las aproximaciones experimentales utilizadas en esta tesis exponen un posible rol en la respuesta al frío de la secuencia del elemento *HSE* encontrada en el promotor del gen *Eni.dhn2*.