

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MAGISTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA**



**EMPALME ALTERNATIVO EN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**  
**BHLH EXPRESADOS EN RESPUESTA A ESTRÉS POR BAJA**  
**TEMPERATURA EN UN HÍBRIDO DE EUCALYPTO.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:

**MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA**

Por: HÉCTOR APABLAZA DONAIRE

Profesora Guía: DRA. MARTA FERNÁNDEZ

Concepción, Chile 2020



© 2020

HECTOR APABLAZA DONAIRE

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

**EMPALME ALTERNATIVO EN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN  
bHLH EXPRESADOS EN RESPUESTA A ESTRÉS POR BAJA  
TEMPERATURA EN UN HÍBRIDO DE EUCALYPTO.**

Profesora Guía

---

Marta Fernández Reyes  
Facultad de Ciencias Forestales  
Universidad de Concepción

Profesora Co-Guía  
Evaluadora Interna



---

Estefanía Tarifeño Saldivia  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Evaluadora Externa

---

Sofía Valenzuela Águila  
Facultad de Ciencias Forestales  
Universidad de Concepción

Directora del Programa

---

Elena Uribe Pérez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Marta Fernández por su apoyo incondicional, comprensión y guía. A la Dra. Estefanía Tarifeño, por su orientación y disposición. A la Dra. Sofía Valenzuela por su perspectiva, orientación y conocimientos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y el Magíster en Bioquímica y Bioinformática por disponer de la capacidad de cómputo para la realización de los análisis.



Al laboratorio de Genómica Forestal y al Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción por brindar las instalaciones en las cuales se llevó a cabo el presente trabajo.

A la Dra. Marta Fernández, Dra. Sofía Valenzuela y el laboratorio de Genómica Forestal por proveer los insumos con los cuales se realizaron las actividades experimentales.

A Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por otorgar la Beca con la cual me fue posible cursar mis estudios de Magíster.

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULOS	
2.1 Hipótesis.....	1
2.2 Objetivo general.....	1
3.3 Objetivos específicos: .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>16</b>
3.1 Identificación y caracterización de proteínas bHLH en <i>E. grandis</i> .....	16
3.2 Caracterización filogenética proteínas bHLH de <i>E. grandis</i> . .....	17
3.3 Material vegetal y datos RNAseq.....	18
3.4 Pre-procesamiento, ensamble de transcriptoma por referencia. ....	20
3.5 Identificación de eventos de empalme alternativo .....	20
3.6 Evaluación de expresión diferencial de exones. ....	21
3.7 GO análisis.....	21
3.8 Validación de exones diferencialmente expresados por qRT-PCR. ....	22
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
4.1 Identificación y caracterización estructural de genes bHLH en el genoma de <i>E. grandis</i> . ....	24
4.2 Caracterización filogenética proteínas bHLH de <i>E. grandis</i> . ....	28
4.3 Identificación de eventos de empalme alternativo .....	30
4.4 Evaluación de expresión diferencial de exones. ....	31
4.5 GO análisis.....	33
4.6. Evaluación expresión relativa. ....	36
<b>V. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>42</b>
<b>VII .ANEXOS .....</b>	<b>57</b>

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Motivos conservados de proteínas EgrbHLH.....26

TABLA 2. Exones diferencialmente expresados entre las comparaciones evaluadas .....33

En el anexo:

ANEXO 2: Alineamiento de genes duplicados..... 58

ANEXO 3. Número de genes EgrbHLH y número de intrones en cada grupo filogenético..... 60

ANEXO 4. Log<sub>2</sub>FC de exones bHLH expresados diferencialmente .....61

ANEXO 5. Información de los partidores diseñados .....65

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. TF putativos de las familias más abundantes en respuesta a la aclimatación y desaclimatación al frío .....	11
FIGURA 2. Ubicación cromosómica de genes bHLH en <i>E. grandis</i> .....	27
FIGURA 3. Árbol filogenético de las proteínas bHLH de <i>A. thaliana</i> y <i>E. grandis</i> .....	29
FIGURA 4. Distribución de eventos de empalme alternativo en <i>E. nitens x globulus</i> .....	31
FIGURA 5. Heatmap de los exones diferencialmente expresados de genes bHLH.....	33
FIGURA 6. Categorización funcional mediante GO de genes que presentan al menos un exón expresado diferencialmente en los tratamientos de frío.....	35
FIGURA 7. Gráficos expresión de exones bHLH correspondientes a tres genes.....	39
<b>En el anexo</b>	
<b>ANEXO 1.</b> Estructura de genes EgrbHLH y ubicación de motivos identificados.....	57

## ABREVIATURAS.

<b>AA</b>	Aceptor alternativo
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>AD</b>	Donante alternativo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico copia
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AS</b>	Empalme alternativo
<b>bHLH</b>	Hélice-bucle-hélice básica
<b>bHLH-MYC</b>	Genes bHLH tipo MYC
<b>CAAF</b>	Aclimatado después de helada
<b>CABF</b>	Aclimatado antes de helada
<b>EA</b>	Exón de expresión variable
<b>EB</b>	Exón de expresión no variable
<b>EglonibHLH</b>	gen/proteína bHLH de <i>E. nitens x globulus</i>
<b>EgrbHLH</b>	gen/proteína bHLH de <i>E. grandis</i>
<b>ES</b>	Omisión de exón
<b>FDR</b>	Probabilidad de falso positivo
<b>GO</b>	Ontología genética
<b>IR</b>	Retención de intrón
<b>LogFC</b>	Logaritmo en base 2 del cambio en la expresión
<b>Mb</b>	Megabases
<b>NA</b>	No aclimatado
<b>pr.</b>	Proceso
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real
<b>RNAseq</b>	Secuenciación de ARN
<b>TF</b>	Factores de transcripción



## RESUMEN.

La superfamilia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básica (bHLH) se encuentra presente en eucariotas y ha sido ampliamente caracterizada en especies no plantares, su estudio en plantas se ha enfocado en procesos implicados en el crecimiento y desarrollo, pero cada vez cobra más relevancia su estudio en procesos de respuesta a estrés abiótico. En el presente estudio se caracteriza por primera vez de forma sistemática la familia bHLH en *Eucalyptus*, utilizando como referencia los datos genómicos de *Eucalyptus grandis*. Se identificaron 153 genes bHLH, los cuales se caracterizaron filogenética y estructuralmente. También por primera vez se estudian eventos de empalme alternativo producidos por la exposición de un híbrido de *Eucalyptus* (*Eucalyptus nitens* x *globulus*) a condiciones de aclimatación al frío y el efecto a nivel de expresión en los genes bHLH. Se lograron identificar un total de 44 genes bHLH de *E. nitens* x *globulus* candidatos a sufrir eventos de empalme alternativo, debido a que presentan exones diferencialmente expresados en condiciones de aclimatación al frío. La expresión de tres exones pertenecientes a diferentes genes fueron validados mediante qRT-PCR, donde se logró determinar que dos de ellos se encontraban diferencialmente expresados.

Por lo que se aporta evidencia de la influencia del empalme alternativo en los transcritos de genes bHLH.



## ABSTRACT

Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor superfamily is present in eukaryotes and has been widely characterized in non-plantar species, its study in plants has focused on processes involved in growth and development, but his study is increasingly relevant in processes of response to abiotic stress. In the present study, for first time the bHLH family is systematically characterized in *Eucalyptus*, using the genomic data of *Eucalyptus grandis* as a reference. 153 bHLH genes were identified and were characterized phylogenetically and structurally. Also for the first time are studied the alternative splicing events produced by the exposure of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus nitens x globulus*) to conditions of cold acclimatization and the effect at the level of expression in the bHLH genes. A total of 44 *E. nitens x globulus* bHLH genes were identified as candidates for alternative splicing events, due to they present differentially expressed exons under conditions of cold acclimatization. The expression of three exons belonging to different genes were validated by qRT-PCR, where it was possible to determine that two of them were differentially expressed.

Thus, evidence is provided of the influence of alternative splicing on bHLH gene transcripts.



## 2.1 Hipótesis

El estrés por frío induce eventos de empalme alternativo que se traducen en una disminución de la expresión de ciertos exones en los genes bHLH en *E. nitens x globulus*.

## 2.2 Objetivo general

Identificar eventos de empalme alternativo de factores transcripcionales bHLH y comparar la expresión diferencial de sus exones a partir de datos de secuenciación masiva de *E. nitens x globulus* en condiciones de aclimatación al frío.



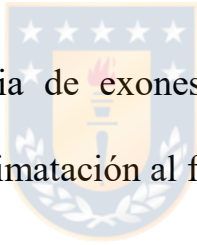
### 3.3 Objetivos específicos:

1. Caracterizar estructural y filogenéticamente los factores transcripcionales bHLH de *Eucalyptus grandis*.

2. Determinar eventos de empalme alternativo en el perfil transcripcional global de *E. nitens x globulus* en respuesta a aclimatación al frío.

3. Comparar la abundancia de exones bHLH expresados en condición control y en respuesta a aclimatación al frío en *E. nitens x globulus*.

4- Validar la expresión diferencial de tres exones bHLH en los tratamientos de aclimatación al frío en *E nitens*, *E globulus* y su híbrido mediante qRT-PCR.



## I. INTRODUCCIÓN

El sector forestal es un pilar fundamental de la economía en Chile, según datos del año 2017 representa el 2,1% del PIB nacional, del cual la Región del Biobío representa el 63,7%, además de concentrar las actividades de silvicultura y extracción, madera, celulosa y papel (Gysling et al., 2018). Según datos del mismo año, las plantaciones forestales cubrían una superficie total de 2.289.525 de hectáreas a nivel nacional, de las cuales un 38,9% se encuentran en la región del Biobío. Del total de las plantaciones un 55,8% corresponden a *Pinus radiata* seguido de *Eucalyptus* (37.5%), donde destacan *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* Maiden.

*E. nitens* y *E. globulus* son especies arbóreas originarias de Australia, pertenecen a la familia *Myrtaceae*, subclase *Rosidae*, división *Magnoliophyta*. Son cultivados en gran parte del mundo debido a su rápida tasa de crecimiento y a que poseen una buena calidad pulpable de la madera (Teulières et al., 2007), por lo que su principal destino es hacia la producción de pulpa de celulosa para la industria papelera. Una de las principales características de *E. nitens* es su alta tolerancia al estrés por frío

en comparación a otras especies del genero *Eucalyptus* (Turnbull & Eldridge, 1983), lo que hace interesante su estudio como modelo, mientras que *E. globulus* produce una de las mejores maderas para la elaboración de pulpa papelera de alta calidad (Torres & Rodríguez, 1991). Una de las estrategias empleadas para producir plantaciones con mejores características es la generación de híbridos a través de programas de mejoramiento genético, es así como se origina *E. nitens x globulus* que es capaz de tolerar temperaturas bajas de forma similar a *E. nitens* y que además posee características deseadas para la madera como *E. globulus* (Volker, 1995).



Las plantaciones de *Eucalyptus spp.* se caracterizan por su poca tolerancia al frío en etapas juveniles (Travert et al., 1997) por lo que su distribución queda restringida a regiones con climas templados, imposibilitando su establecimiento en sitios de gran altitud. A esto se suma la inestabilidad climática que se vive actualmente en el país, lo que hace más frecuente la ocurrencia de heladas primaverales (Conaf, 2017), suceso que también ocurre a nivel mundial (Inouye, 2000), y puede llegar a causar pérdidas en las plantaciones juveniles debido al daño en el tejido foliar y el posterior



ataque de patógenos oportunistas. A raíz de lo mencionado es de gran importancia el estudio de los procesos moleculares que permiten comprender mejor la respuesta de esta especie a estrés abiótico, específicamente a estrés por frío.

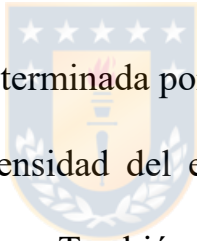
El estrés es cualquier perturbación adversa ocasionada por una causa externa que afecte al metabolismo, el crecimiento o el desarrollo de una planta (Lichtenthaler, 1998), por lo general desencadena en respuestas moleculares, bioquímicas o fisiológicas que apuntan a mantener las funciones vitales del individuo (Taiz & Zeiger, 2006). Si la causa de esta perturbación es un organismo se denomina estrés biótico, mientras que si es ocasionado por una variación desfavorable del ambiente es denominado estrés abiótico. En condiciones naturales las plantas siempre se encuentran sometidas a uno o más tipos de estrés debido a que son individuos sésiles, por lo que deben tolerar o resistir ante las condiciones ambientales desfavorables (Mahajan & Tuteja, 2005).

La temperatura ambiental es de gran relevancia en la fisiología y bioquímica de las plantas, esto debido a que no poseen un mecanismo de

termorregulación. La temperatura puede afectar en numerosos procesos fisiológicos tales como la división celular, la absorción de nutrientes, la acumulación de azúcares, fotosíntesis, respiración entre muchos otros (Taiz & Zeiger, 2006), todos estos procesos son determinantes en la producción de biomasa vegetal y por lo tanto en la productividad (Niinemets, 2010).

Se pueden distinguir dos tipos de estrés por frío en plantas, el estrés por enfriamiento que ocurre a temperaturas inferiores a la óptima del metabolismo de cada especie, esto ocasiona cambios en la estructuración de membranas, modificación de la estructura y la síntesis de proteínas, disminuye la tasa fotosintética y respiratoria, también afecta negativamente en el crecimiento y produce alteraciones en el desarrollo (Taiz & Zeiger, 2006). Por otro lado, el estrés por congelación (temperaturas inferiores a 0°C) puede ocasionar daños aún mayores e irreversibles llegando a producir muerte del tejido e incluso del individuo, esto se debe al daño mecánico ocasionado por los cristales de hielo, que al formarse pueden dañar membranas y organelos produciendo muerte celular (Beck et al., 2007; Pearce & Ashworth, 1992; Taiz & Zeiger, 2006). Además las temperaturas bajo cero disminuyen el agua disponible en el citoplasma, ya que se

produce deshidratación debido a la formación de cristales de hielo en el apoplasto (Wisniewski et al., 2003, 2018), por lo que el organismo entra en estado de sequía fisiológica, lo que produce estrés hídrico y desencadena respuestas propias de este. Además las rutas de señalización para estrés por salinidad, sequía y frío pueden interactuar con el ácido abscísico (ABA), y converger en múltiples pasos (Gusta & Wisniewski, 2013; Wisniewski et al., 2003), por lo que pueden desencadenar respuestas comunes.



La tolerancia al estrés es determinada por la respuesta que genere una planta y va a depender de la intensidad del estrés, el tiempo de exposición, la especie, la edad y el genotipo. También es importante el estado fisiológico, al determinar qué tan preparado se encuentra el individuo para soportar el estrés. En el caso del estrés por frío pueden distinguirse tres etapas, endurecimiento o aclimatación, endurecimiento y recuperación (Fowler et al., 2005). Todas estas etapas implican cambios en la expresión génica y el metabolismo celular (Thomashow, 1999). Entre algunas de las respuestas específicas se pueden mencionar la síntesis de proteínas anticongelantes (Thomashow, 1998), la síntesis de ácidos grasos insaturados y la síntesis de solutos compatibles que tienen como objetivo retener el agua en la célula

para así evitar la deshidratación producto de la formación de hielo extracelular (Walker et al., 2008).

En el último tiempo se han realizado numerosos estudios para poder comprender los mecanismos de tolerancia al frío y el proceso de aclimatación en *Eucalyptus* a distintos niveles, desde morfo-fisiológico hasta genético (Aguayo et al., 2016, 2019; Butnor et al., 2019; Fernández et al., 2015; Keller et al., 2013; Liu et al., 2014; Navarrete-Campos et al., 2013; Nguyen et al., 2017). La plasticidad de la expresión génica es de gran relevancia en la adaptación de un organismo (Swindell et al., 2007) ya que es capaz de desencadenar respuestas a condiciones ambientales adversas a nivel fisiológico y morfológico. La expresión génica está determinada en gran medida por los factores de transcripción (TF), estos se transcriben en respuesta a un estímulo, y tienen como objetivo inducir o reprimir la expresión de otros genes. El estímulo ambiental es sentido en la membrana celular, donde se produce un cambio local y transitorio en el potencial (Vian et al., 1996) o activan canales (Kurusu et al., 2013). Posteriormente a través de mensajeros secundarios como el calcio (Wurzinger et al., 2011) o especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno

(Kovtun et al., 2000) se desencadenan cascadas de fosforilaciones de proteínas quinasas que activan o desactivan TF que son capaces de interactuar con regiones específicas de los promotores. Al unirse a un elemento en *cis* del ADN los TF facilitan la unión de otros componentes de la maquinaria transcripcional como la ARN polimerasa y otros TF, lo que finalmente produce la inducción de genes de respuesta (Banerjee & Roychoudhury, 2015). Los TF pueden clasificarse como de respuesta temprana, ya que se activan de forma rápida pero transitoria y tienen como objetivo inducir la expresión de genes de respuesta rápida o de otros TF que actuarán en etapas avanzadas del estrés. Por otra parte están los de respuesta tardía que se transcriben posteriormente pero de manera estable en el tiempo y tienen como finalidad expresar genes target que en conjunto producirán un efecto a nivel fisiológico, por ejemplo la síntesis de solutos (Naser et al., 2010), la producción de antioxidantes (Martínez-Gutiérrez et al., 2012), y otros procesos que apuntan a tolerar o resistir el estrés (Chen et al., 2002). Entre las familias de TF en plantas más relevantes se pueden mencionar AP2/ERF, WRKY, MYB y una de las más abundantes es la superfamilia bHLH.

La superfamilia de TF hélice-bucle-hélice básica (bHLH) se encuentra presentes en eucariotas, han sido ampliamente caracterizadas en especies no plantares, especialmente en mamíferos (Toledo-Ortiz et al., 2003). Estas proteínas tienen un dominio firma de aproximadamente 60 aminoácidos y presentan dos regiones con una funcionalidad característica. En el extremo N-terminal se encuentra la región básica, que tiene como función principal la unión al ADN, esta consta de ~15 aminoácidos de los cuales la mayoría son de naturaleza básica. Por otra parte en el extremo C terminal se encuentra la región HLH que tiene como función contribuir a la dimerización del factor de transcripción debido a que se encuentra conformado principalmente por residuos hidrofóbicos que forman hélices anfipáticas separadas por un loop de longitud variable (Draeger & Mullen, 1994; Massari & Murre, 2000). Algunas proteínas bHLH forman homodímeros o restringen su actividad de heterodimerización a miembros de la familia estrechamente relacionados. Por otro lado, algunos pueden formar heterodímeros con miembros de otras familias de TF (Littlewood & Evan, 1998).

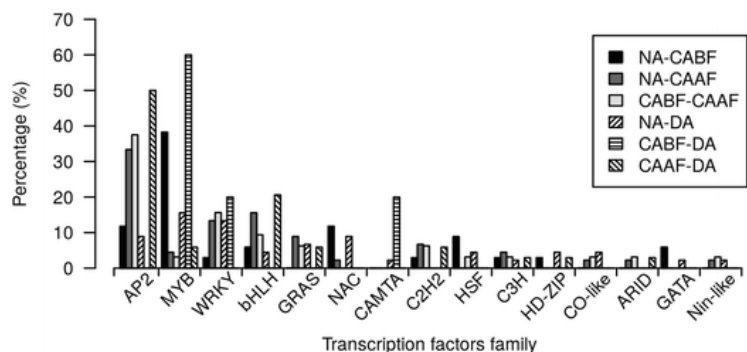
El motivo de la secuencia de ADN central reconocido por las proteínas bHLH es una secuencia de hexanucleótidos consenso conocida como la caja E (5'-CANNTG-3'). Se cree que la dimerización y el reconocimiento de diferentes E-boxes proporcionan mecanismos mediante los cuales las proteínas bHLH generan suficiente diversidad para regular una variedad de diferentes programas transcripcionales (Fairman et al., 1993). En animales las proteínas bHLH se han clasificado en seis grupos principales (A-F) según su afinidad por distintas cajas y secuencias en promotores, además de su funcionalidad (Atchley & Fitch, 1997; Dang et al., 1992; Jones, 2004; Ledent & Vervoort, 2001). Por ejemplo las proteínas del grupo A se unen a la variante de la caja E (CAGCTG) e incluyen proteínas como MyoD, Twist, Acheate-Scute, entre otras. El grupo B incluye un gran número de proteínas no relacionadas funcionalmente, como Pho4 y R, que se unen a la caja G (CACGTG). También se da el caso de grupos que presentan particularidades en cuanto al dominio de dimerización como el grupo C que está formado por proteínas que tienen un segundo dominio de interacción proteína-proteína, el dominio PAS, y que se unen a secuencias que no son E-box (NACGTG o NGCGTG) (Toledo-Ortiz et al., 2003).

En plantas la familia bHLH ha sido estudiada por su rol en procesos de crecimiento y desarrollo, forman la segunda familia más grande de TF (Nuno Pires & Dolan, 2010). Diferentes estudios filogenéticos propusieron la clasificación de bHLH en plantas en 15 a 25 subgrupos (Buck & Atchley, 2003; Heim et al., 2003; X. Li et al., 2006; Toledo-Ortiz et al., 2003). Su estudio en el proceso de respuestas a los factores ambientales en las plantas ha cobrado relevancia (Castillon et al., 2007; Ramsay & Glover, 2005), como en casos de estrés por frío (Feng et al., 2012; Niu et al., 2017; Xu et al., 2014).



Según el trabajo realizado por (Gaete-Loyola et al., 2017), donde se analizó el perfil transcripcional de *E. nitens*, se evidenció que los genes bHLH se encuentran entre las familias de TF significativamente más expresadas en condiciones de aclimatación al frío (figura 1), también se ha reportado la presencia de esta familia en transcriptomas de *Eucalyptus globulus* bajo condiciones de estrés por frío (Aguayo et al., 2019).





**Figura 1:** TF putativos de las familias más abundantes en respuesta a la aclimatación y desaclimatación al frío. La escala de grises representa la aclimatación al frío, las condiciones de desaclimatación se presentan en barras rayadas. NA, no aclimatado; CABF, aclimatado antes de las heladas; CAAF, aclimatado después de las heladas, DA desaclimatado (Extraído de Gaete-Loyola *et al.* 2017).

Si bien la expresión de un gen o una familia de genes es relevante, también hay estudios que demuestran que el control postranscripcional del metabolismo del ARN juega un rol importante (Floris et al., 2009) y está muy extendido en los genomas de las plantas. Un ejemplo de lo mencionado es que más del 60% de los genes que contienen intrones se someten a un empalme alternativo (AS) en *Arabidopsis* (Syed et al., 2012). Se sabe que una gran parte de los genes que codifican TF presentan isoformas (Barbazuk et al., 2008; G. Li et al., 2012; Mastrangelo et al., 2012; Severing et al., 2012). El empalme alternativo a menudo responde al

estrés por frío en las plantas (Iida et al., 2004; Palusa et al., 2007), por lo que se considera como una forma de percibir las fluctuaciones de temperatura y modular la actividad de un factor de transcripción (Seo et al., 2013). Por lo general el fenómeno de AS se asocia a la generación de isoformas que carecen de un dominio de unión al ADN. Un ejemplo es el gen *ccal*, que experimenta un evento de AS, ya que se producen dos variantes de empalme, CCA1 $\alpha$  y CCA1 $\beta$ , donde CCA1 $\beta$  es una proteína truncada que carece del dominio de unión al ADN, pero contiene los dominios responsables de la dimerización, por lo que se generan dímeros que no pueden unirse al ADN (Park et al., 2012; Seo et al., 2013).

El AS de bHLH ha sido evidenciado en trabajos donde se ha identificado que ciertas isoformas carecen de una región de unión al ADN (básica) y, en consecuencia, interrumpen la función de otros TF, al inutilizarlos a través de la dimerización (Li et al. 2012). Existen otros estudios que confirman un empalme alternativo de bHLH en deficiencia de Fe<sup>+2</sup> (Rodríguez-Celma et al., 2013) y en respuesta a estrés por exceso de luz (Seo et al., 2013).

En base a lo mencionado cabe preguntar si la familia bHLH de *Eucalyptus* se encuentra regulada mediante eventos de empalme alternativo en condiciones de estrés por frío. Para dilucidar esto es fundamental caracterizar los miembros de esta familia en *E. grandis*, el único *Eucalyptus* con un genoma disponible, información que será tomada como base para posteriormente utilizar datos RNA-seq de un híbrido de *Eucalyptus* (*Eucalyptus nitens x globulus*).



## II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

## III. METODOLOGÍA

### 3.1 Identificación y caracterización de proteínas bHLH en *E. grandis*.

Se obtuvieron las secuencias de proteínas de *E. grandis* (Hayes *et al.* 2014) desde Phytozome (Goodstein *et al.* 2012), posteriormente se realizó una búsqueda de dominios utilizando hmmscan (Finn *et al.* 2012) y la base de datos Pfam (El-Gebali *et al.* 2019). Se seccionaron las proteínas que contenían el dominio bHLH (PF00010.26) y bHLH-MYC (PF14215.6) que luego fueron validadas por Prosite (Hulo *et al.* 2006), las secuencias de proteínas obtenidas se conservaron y nombraron como EgrbHLH, se les dio un número correlativo a su identificador de Phytozome. Las secuencias de proteínas EgrbHLH se cargaron en ExPASy (Artimo *et al.*, 2012) para obtener características como el número de aminoácidos, punto isoeléctrico y peso molecular. El número de intrones y la ubicación cromosómica de los genes se obtuvieron desde Phytozome. Para identificar los genes duplicados, se realizaron alineamientos de pares de secuencias considerando una identidad y cobertura mayor al 70%. Se realizó un alineamiento múltiple de las proteínas EgrbHLH en MUSCLE (Edgar,

2004), posteriormente se construyó un árbol filogenético empleando el método de máxima verosimilitud en RAxML (Stamatakis, 2014), que junto con las anotaciones genómicas (GFF3) de los genes bHLH de *E. grandis*, se emplearon como input en GSDS (Hu et al., 2015). En paralelo las secuencias de proteínas EgrbHLH se cargaron en el programa MEME (Bailey & Elkan, 1994) para identificar los motivos conservados, se ajustó el tamaño óptimo del motivo entre 10- 100 y un número máximo de motivos a identificar de 10, las secuencias de los motivos predichos fueron anotadas por CDD (Marchler-Bauer et al., 2017). Para obtener mayor información de los genes EgrbHLH, estos fueron anotados mediante BLASTx contra la base de datos de proteínas de *Arabidopsis thaliana*, posteriormente utilizando los códigos de *A. thaliana* se evaluaron mediante ontología genética en AgriGO (Du et al., 2010) y DAVID (Sherman & Lempicki, 2009).

### **3.2 Caracterización filogenética proteínas bHLH de *E. grandis*.**

Se realizó un alineamiento múltiple en MUSCLE (Edgar, 2004) con las secuencias de proteínas EgrbHLH identificadas junto con las proteínas bHLH de *Arabidopsis thaliana* (Toledo-Ortiz et al., 2003). Posteriormente

se construyó un árbol filogenético empleando RAxML (Stamatakis, 2014), se utilizó el método de máxima verosimilitud y un bootstrap de 1000, para visualizar y agrupar el árbol filogenético se utilizó iTOL (Letunic & Bork, 2019).

### **3.3 Material vegetal y datos RNaseq.**

Se utilizaron muestras de ADNc procedentes de proyectos previamente realizados en el laboratorio de Genómica Forestal. Para validación mediante qRT-PCR se utilizaron muestras de *E. nitens* correspondientes a una familia de medios hermanos (Gaete-Loyola et al., 2017), para de *E globulus* (Fernández et al., 2012) y *E. nitens x globulus* (FONDECYT 11121559) se utilizó un genotipo de cada especie. Las plantas utilizadas en estos proyectos tenían aproximadamente 6 meses de edad y fueron sometidas al perfil de aclimatación descrito por Fernandez et al., (2012). El tratamiento consistió en someter a las plantas a 10 días de 14 horas de duración a 20/12 ° C (día / noche, al final del día 10 se realizó el primer punto de muestreo correspondiente a la condición control NA (no aclimatado). Posteriormente las plantas fueron expuestas a 7 días con una duración de 10 horas a 8/4 ° C (día / noche), en el día 17 se realizó el segundo punto de

muestreo correspondiente a aclimatado antes de helada (CABF). Luego las plantas fueron expuestas a cuatro heladas nocturnas de  $-2^{\circ}\text{C}$  en los días 21 a 24, al día siguiente de la última helada se realizó el último punto de muestreo, aclimatado después de helada (CAAF). En todos los puntos de muestreo se tomaron muestras de 3 plantas para cada especie. Las extracciones de ARN y síntesis de cDNA se realizaron según el protocolo indicado en Gaete-Loyola et al., (2017).

Los datos de RNAseq de *E. nitens x globulus* se generaron en un ensayo del año 2014 (FONDECYT 11121559) mediante secuenciación Illumina single end obtenidos a partir de tres puntos de muestreo NA, CABF y CAAF, se secuenciaron 3 réplicas biológicas por condición. Se aisló ARN total de las 9 muestras a partir de tejido foliar siguiendo el procedimiento de extracción de ARN por CTAB (Chang et al., 1993). Utilizando 2  $\mu\text{g}$  de ARN se prepararon nueve bibliotecas de secuencias con el kit TruSeq mRNA stranded Kit (Illumina) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

### **3.4 Pre-procesamiento, ensamble de transcriptóma por referencia.**

Los datos RNA-seq de *E. nitens x globulus* fueron pre-procesados con el programa cutadapt (Martin, 2011), se eliminaron restos de adaptadores y reads de baja calidad. Posteriormente las 9 muestras procesadas se mapearon contra el genoma de *E. grandis* utilizando Tophat2 (Kim et al., 2013) con los parámetros por defecto. Se emplearon los archivos de mapeo obtenidos desde Tophat2 para generar ensambles de transcriptomas guiados por referencia utilizando Cufflinks (Trapnell et al., 2012), este programa genera ensambles de las transcripciones que mejor representan una muestra. Posteriormente para generar un transcriptoma global, se fusionaron los sets de transcripciones empleando la función cuffmerge.

### **3.5 Identificación de eventos de empalme alternativo**

Utilizando la función cuffcompare de Cufflinks se fusionaron los archivos de anotación (GTF) generados para cada muestra con sus respectivas réplicas utilizando como referencia el archivo de anotación de *E. grandis*. Se ignoraron los transcritos de referencia que no se superponen con ningún transcrito ensamblado en al menos una de las réplicas. Adicionalmente se generó un archivo de anotación global fusionando todas las muestras de la



misma forma descrita anteriormente. Los cuatro archivos de anotación obtenidos (para NA, AAH, ADH y global) se utilizaron como entrada para el software ASTALAVISTA (Foissac & Sammeth, 2007), para identificar los tipos de eventos de splicing presente en cada condición y los totales.

### **3.6 Evaluación de expresión diferencial de exones.**

Se realizó el conteo de las lecturas mapeadas de cada muestra utilizando la función FeatureCounts de Subread (Liao et al., 2014), se eliminaron los conteos que suman menos de 20. El análisis de expresión de exones se realizó empleando el paquete de R DEXSeq (Anders et al., 2012), se evaluaron las comparaciones NA-CAAF, NA-CABF y CABF-CAAF, los resultados se filtraron con un FDR < 0.05.

### **3.7 GO análisis.**

Se utilizó BLASTP para identificar los ortólogos en *A. thaliana* de los genes que sufren eventos de splicing en *E. nitens x globulus* y se encuentran diferencialmente expresados en alguna de las condiciones de aclimatación al frío. Posteriormente los identificadores de *A. thaliana* fueron ingresados a TAIR (Berardini et al., 2015) para obtener los códigos GO . Finalmente los

códigos GO fueron introducidos en WEGO 2.0 (Ye et al., 2018) utilizando los parámetros por defecto para visualizar los resultados.

### **3.8 Validación de exones diferencialmente expresados por qRT-PCR.**

Se realizó PCR en tiempo real para validar la expresión cuantificando un exón a la vez, se validó un exón expresado diferencialmente junto con otro exón del mismo gen que presenta una expresión constante en los tratamientos como un control. Se evaluó la comparación NA y CAAF, se utilizaron muestras de ADNc que se encuentran disponibles de *E. nitens*, *E. globulus* e híbrido. Los partidores fueron diseñados mediante Primer 3 (Untergasser et al., 2012) en los exones correspondientes (Suplementario TS6) y se evaluó eficiencia considerando un rango entre 90% y 110%. Cada reacción de qRT-PCR contenía 3 µL de ADNc, 4 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 0,3 µM de cada partidor específico, dando un volumen final de 20uL. Se utilizó un genotipo por especie (familia en el caso de *E. nitens*), tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas respectivamente. Se utilizaron housekeepings correspondientes a los genes EF1 $\alpha$  y UBC9 para *E. globulus* junto con GAPDH y Eif4a para *E. nitens* e híbrido según lo descrito por (Fernandez et al., 2012).

Posteriormente se realizó el análisis de expresión relativa a través del método delta-delta-CT. Se realizó un test de análisis de varianza ANOVA con intervalo de confianza de 95% ( $p < 0,05$ ) y un test a posterior de LSD Fisher (least significant difference) para identificar diferencias significativas entre la expresión del exón en las condiciones evaluadas.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación y caracterización estructural de genes bHLH en el genoma de *E. grandis*.

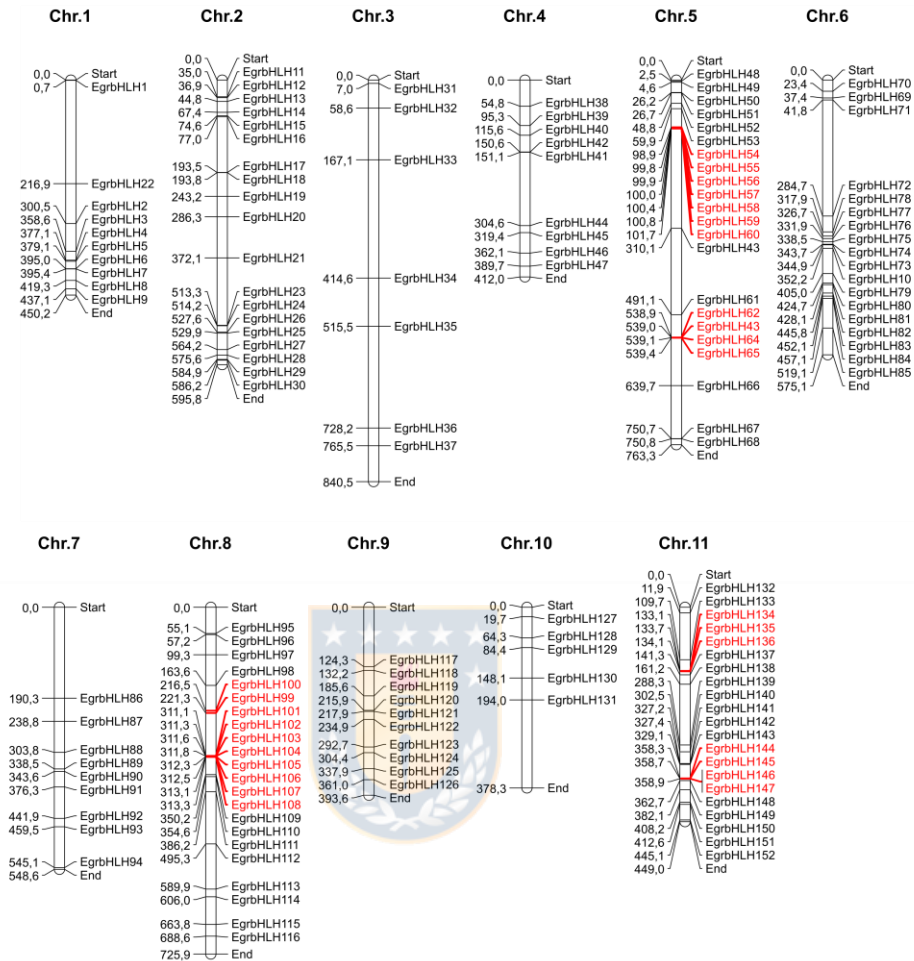
En total, 158 TF bHLH putativos fueron identificados por HMMscan, luego se confirmó la presencia del dominio mediante Prosite, lo que arrojó un total de 153 secuencias de proteínas bHLH en *E. grandis*. El número de proteínas bHLH es muy similar a los 159 identificados en *Solanum lycopersicum* (Sun et al., 2015), mayor que los 94 y 124 identificados en *Vitis vinifera* (P. Wang et al., 2018) y *Solanum tuberosum* (R. Wang et al., 2018) respectivamente, pero menos que los 188 identificados en *Malus domestica* (Mao et al., 2017). Según su código de referencia se les asignó un nombre correlativo de EgbHLH1 a EgbHLH153. El largo de las secuencias de proteínas EgbHLH varió de 90 (EgbHLH142) a 941 (EgbHLH28) aminoácidos. La longitud del dominio es de aproximadamente 50 aminoácidos, lo que coincide con lo reportado para esta familia que es de entre 50 y 60 aminoácidos (N. Pires & Dolan, 2010), a excepción de las proteínas que presentan el dominio bHLH-MYC. El peso molecular varió entre 10.3 (EgrbHLH141) a 102 (EgrbHLH28) KDa.

En cuanto a la estructura de los genes, el número de intrones va desde cero hasta diez, un máximo considerablemente mayor al de otras plantas herbáceas como el arroz, donde el número de intrones varía ente cero y cuatro (Li et al., 2006). Doce genes no contenían intrones (7,8%), 21 genes contenían solo un intrón (13.7%) y el mayor porcentaje de genes presentaban dos intrones (20,9%). Los genes duplicados en tándem contienen un número similar de intrones al igual que los ubicados en un mismo clado filogenético. En la búsqueda de motivos en MEME, se identificaron motivos de entre 23 a 43 aminoácidos (Tabla 1), de estos los dos más abundantes correspondían a bHLH, cuatro a bHLH-MYC y cuatro a motivos no identificados, lo que puede deberse a que las secuencias de aminoácidos fuera de la región bHLH son generalmente divergentes (N. Pires & Dolan, 2010). Cada gen presentaba como mínimo un motivo y como máximo 8, EgrbHLH30, EgrbHLH78, EgrbHLH82, EgrbHLH89 y EgrbHLH125 presentaban solo un motivo, mientras que 9 genes presentaban el máximo número de motivos (anexo 1).

Tabla 1: Motivos conservados de proteínas EgrbHLH.

Motif	Width	Motif sequence	Anotation
1	26	AERRRREKJNERLSALRSLVPNGSKM	-
2	26	DKASILDEAINYIKELQEQVKELSEK	bHLH_SF super family
3	27	LLELIRVLEELGLEVLNASVSTVGD	-
4	23	EAPKKDYIHVRARRGQATDSHSJ	bHLH_SF super family
5	40	DVTDPEWYYJVSVTRSYSSEDDGJPRALRSGGHI WLSGE	bHLH-MYC_N super family
6	43	QQLVHLILQTRPEDWVYSIFWQPSRDDHGRLVLT WGDGHFRGT	bHLH-MYC_N super family
7	26	LSLPEVEVKVVGKEALIKVHSEKRPG	-
8	25	HGVLELGSTEIIPEDWSLVQLVKSL	bHLH-MYC_N super family
9	36	SMNSGAKJGFKSPEIEJRDHGSSLEVILISGLDGQF	-
10	19	CERVKEARMAGIQTIVCIP	bHLH-MYC_N super family

Los genes se encuentran presentes en todos los cromosomas (Figura 2), solo uno (EgbHLH153) corresponde a un scaffold no asignado a un cromosoma. Los cromosomas 5 y 8 son los que presentan una mayor cantidad de genes (22 genes cada uno), seguidos muy de cerca con el cromosoma 11 (21 genes). En estos mismos cromosomas también se pueden apreciar clusters de genes duplicados en tándem, solo existen dos eventos de duplicación extra cromosomal, EgrbHLH15 y EgrbHLH48 junto con EgrbHLH96 y EgrbHLH131 (anexo 2).



**Figura 2:** Ubicación cromosómica de genes bHLH en *E. grandis*, las posiciones de los genes y los tamaños de los cromosomas se indican en megabases (Mb), el tamaño de cada cromosoma se encuentra señalado por “End”, el color rojo indica grupos de genes duplicados en tandem.

En total se lograron anotar 55 genes EgbHLH con 42 genes de *A. thaliana*, se seleccionaron los que presentaban un porcentaje de identidad y una

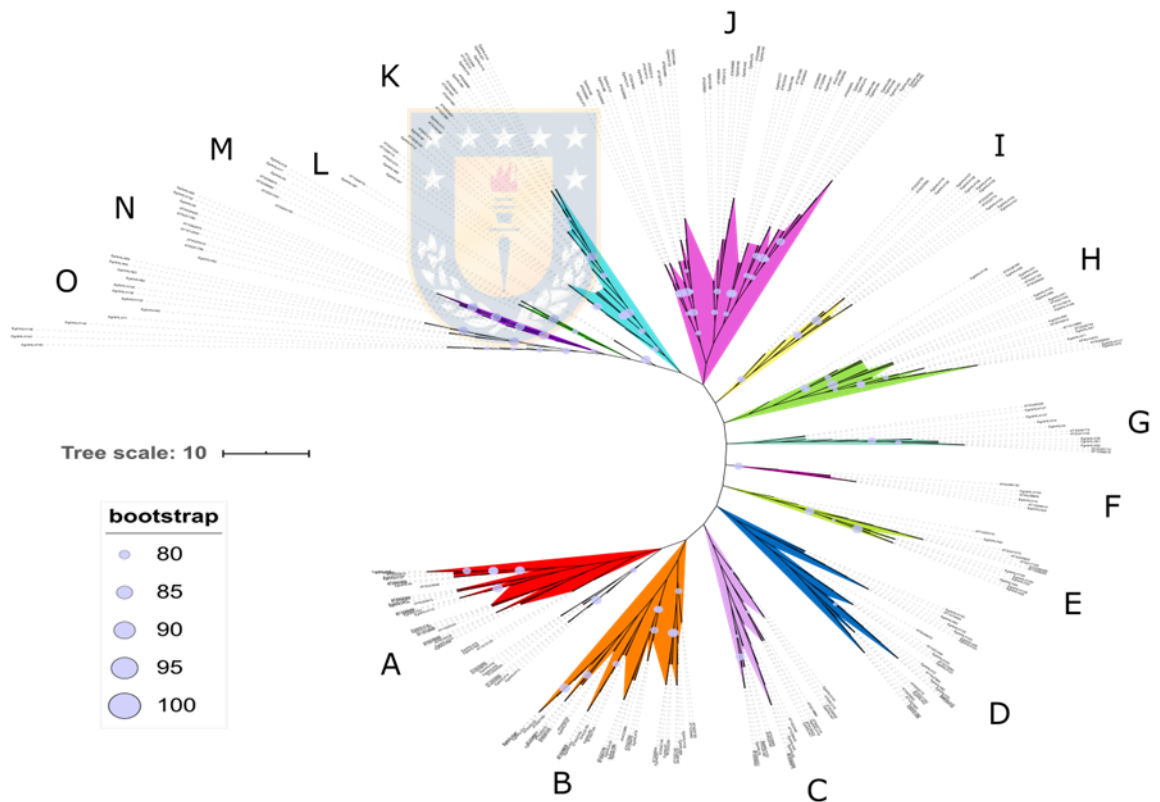
cobertura mayor a 45% y un e-valor inferior a  $1^{-10}$ . Solo cuatro genes fueron anotados con proteínas que no pertenecían a proteínas bHLH, esto puede deberse a la gran diversidad que presentan los TF bHLH en su región variable, además estos genes en *A. thaliana* actúan interactuando con el ADN por lo que presentan una funcionalidad similar.

#### **4.2 Caracterización filogenética proteínas bHLH de *E. grandis*.**

Las secuencias se clasificaron en un total de 15 grupos (Figura 3), muy similar a los 15 identificados en *S. tuberosum* (P. Wang et al., 2018), pero menos que los 21 de *S. lycopersicum* (Sun et al., 2015) y 18 de *M. domestica* (Mao et al., 2017), también coincide con la clasificación propuesta para bHLH en plantas (Nuno Pires & Dolan, 2010). El grupo más numeroso es el grupo J con 47 secuencias, seguido por el grupo B con 39, de estos grupos 26 y 15 proteínas respectivamente corresponden a *E. grandis*. El grupo con menor representantes es el grupo L con solo 2 proteínas. El grupo O destaca debido a que está conformado únicamente por proteínas de *E. grandis*. Las proteínas en clados adyacentes en la mayoría de los casos comparten su arquitectura en cuanto a motivos, sin embargo debido a que los motivos de aminoácidos en bHLH no están altamente



conservados (Nuno Pires & Dolan, 2010) no se pueden apreciar motivos conservados en grupos filogenéticos. Se puede apreciar un número similar de intrones entre grupos (anexo 3), el patrón de posiciones intrónicas puede proporcionar evidencia importante para apoyar las relaciones filogenéticas en una familia de genes (X. Li et al., 2006). En los grupos más grandes (C, E y K) la estructura intrón-exón es similar solo a nivel de clados.

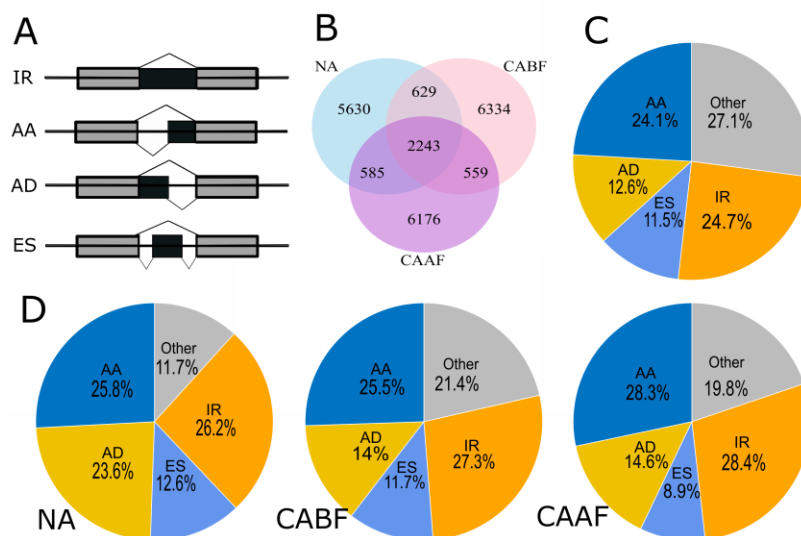


**Figura 3:** Árbol filogenético de las proteínas bHLH de *A. thaliana* y *E. grandis*. El árbol se construyó por el método de máxima verosimilitud, se encuentra sin enraizar y se utilizó un bootstrap de 1000. Los grupos se

encuentran delimitados por colores y se nombraron con una letra (A-P), los círculos de colores junto al nombre de la proteína indica la especie de la que proviene, rojo para *A. thaliana* y negro para *E. grandis*.

### **4.3 Identificación de eventos de empalme alternativo**

Se utilizó ASTALAVISTA para identificar los eventos de AS en *E. nitens x globulus*, utilizando como referencia el genoma de *E. grandis*. Cuatro eventos fueron los más abundantes, retención de intrón (IR) omisión de exón (ES), aceptor alternativo (AA) y donante alternativo (AD) (Figura 3A) que corresponden al 73% del total de eventos (Figura 4C), el resto de eventos menos abundantes y más complejos se agruparon como “otros”. Al realizar una revisión, comparando estos resultados con los obtenidos por estudios (Filichkin et al., 2010; Vitulo et al., 2014; Zhu et al., 2018), se encuentra consistencia. Cabe destacar que también indican a IR como el evento más recurrente en plantas. En total 22.156 genes de *E. nitens x globulus* presentan algún tipo de evento de AS, de los cuales 13.069 se encuentran exclusivamente en las condiciones de estrés por frío (figura 4B). En todas las condiciones el evento de retención de intrón es el más abundante.



**Figura 4:** Distribución de eventos de empalme alternativo en *E. nitens x globulus*. A) Los cuatro eventos más abundantes y su estructura intrón-exón. B) Número de genes que prestan eventos de empalme alternativo en las distintas condiciones y los genes comunes en las intersecciones. C) Frecuencia de eventos de AS en los tres tratamientos. D) Frecuencia de eventos de AS en NA, CABF y CAAF.

#### 4.4 Evaluación de expresión diferencial de exones.

A modo general, en el perfil transcripcional se identificaron 11.614, 2.391 y 9.149 genes que presentaban al menos un exón diferencialmente expresado en la comparación NA-CAAF, CABF-CAAF y NA-CABF respectivamente (Tabla 2). La comparación NA-CAAF es la que muestra una mayor cantidad de exones expresados diferencialmente,

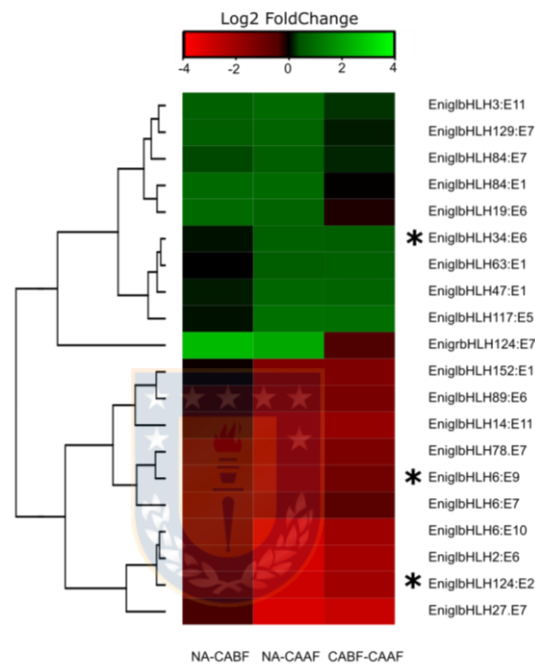
mientras CABF-CAAF presenta el menor número, lo que podría deberse a la severidad del tratamiento del frío al que las plantas fueron sometidas en CAAF.

Tabla 2. Exones diferencialmente expresados entre las comparaciones evaluadas y el número de genes correspondientes.

Comparación	Regulación	Exones	Genes
NA-CAAF	Up	16.393	
	Down	22.593	
	<b>Total</b>	<b>38.986</b>	<b>11.614</b>
NA-CABF	Up	2.281	
	Down	1.792	
	<b>Total</b>	<b>4.073</b>	<b>2.391</b>
CABF-CAAF	Up	10.820	
	Down	15.388	
	<b>Total</b>	<b>26.208</b>	<b>9.149</b>

En cuanto a los genes bHLH, se identificaron 143 exones diferencialmente expresados que corresponden a 44 genes (anexo 4). Se muestran

gráficamente los resultados de expresión de los 10 exones con mayores  $\log_2FC$  y los 10 con menor  $\log_2FC$  (Figura 5).

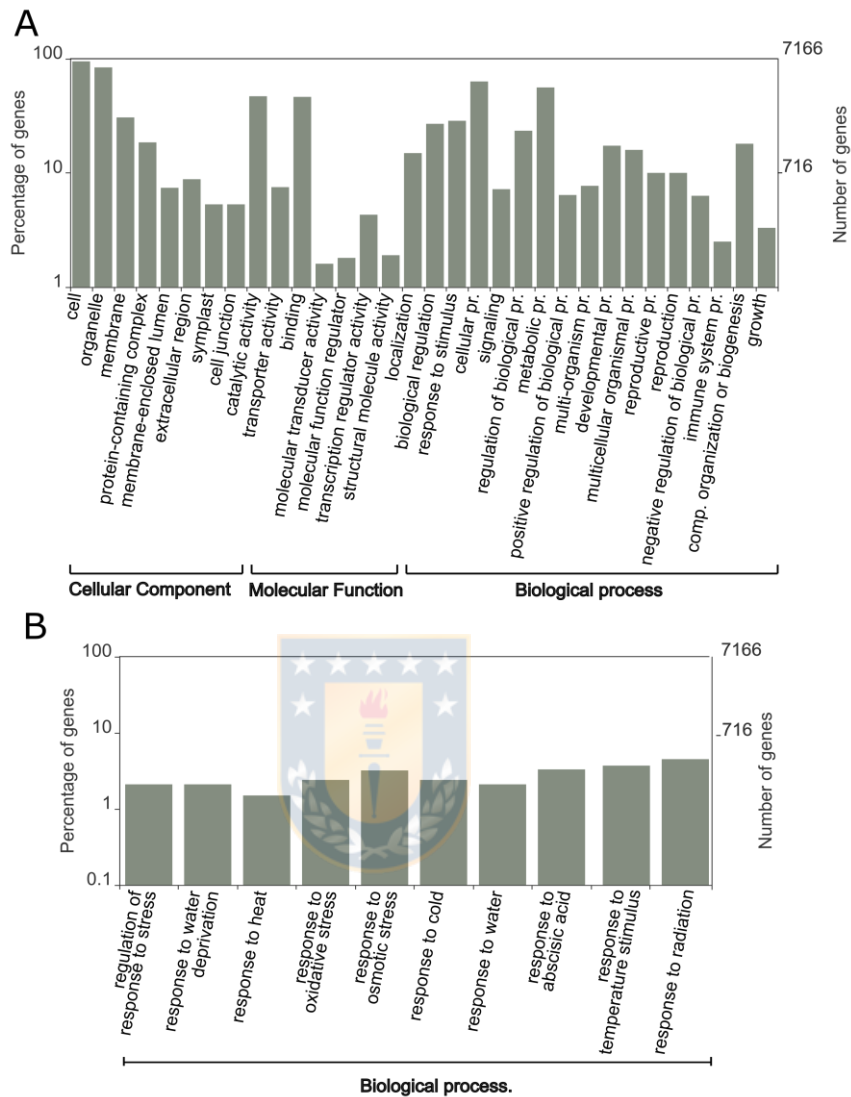


**Figura 5:** Heatmap de los exones diferencialmente expresados de genes bHLH, se muestran los diez exones con el mayor LogFC (verde) y con menor LogFC (rojo). Se marca con un asterisco los exones que fueron validados mediante qRT-PCR.

#### 4.5 GO análisis.

Sumando todas las tres comparaciones se identificaron 12.292 genes que presentaban al menos un exón diferencialmente expresado, de los cuales se

lograron anotar 7.166 con *A. thaliana*. Para tener una visión general de la ubicación, funciones y proceso (pr.) biológico en los que participan los genes que sufren AS en condiciones de frío en híbrido, se generó un gráfico (Figura 6A) con las categorías GO superiores y más representadas. Entre las categorías relacionadas a estrés (Figura 6B), cabe destacar que se identificaron 172 genes en respuesta a frío, 226 genes de respuesta a estrés osmótico y 233 genes de respuesta a ABA. El estrés osmótico es una de las principales consecuencias del frío en plantas (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Saviouré et al., 1997), mientras que el ABA es la fitohormona que regula numerosas vías de respuesta a estrés abiótico (Nakashima et al., 2014; Tuteja, 2007). El resto de las categorías relacionadas con estrés no están directamente implicadas en la respuesta a frío, sin embargo es importante recordar que las rutas de respuesta a estrés abiótico pueden converger en múltiples pasos (Gusta & Wisniewski, 2013; Wisniewski et al., 2003) por lo que estos genes también son potenciales candidatos a regular la respuesta a frío.



**Figura 6:** Categorización funcional mediante GO de genes que presentan al menos un exón expresado diferencialmente en los tratamientos de frío. A) Gráfico generado con las categorías GO superiores, mostrando las clasificaciones de componente celular, función molecular y proceso biológico. B) Grafico generado con procesos biológicos que se encuentran involucrados en la respuesta a estrés abiótico. Ambos gráficos se presentan en escala logarítmica.

#### 4.6. Evaluación expresión relativa.

Se tomaron tres exones correspondientes a tres genes (bHLH6, 34 y 124) entre los reportados con anterioridad en el análisis de expresión para validarlos mediante qRT-PCR (Figura 7). Se validaron en el genotipo de estudio (*E. nitens x globulus*) y sus especies parentales (*E. nitens*, *E. globulus*). La muestra calibradora utilizada fue un rameto de la condición NA de *E. nitens*. El detalle de los exones evaluados y los partidores se muestra en el material suplementario (anexo 5).

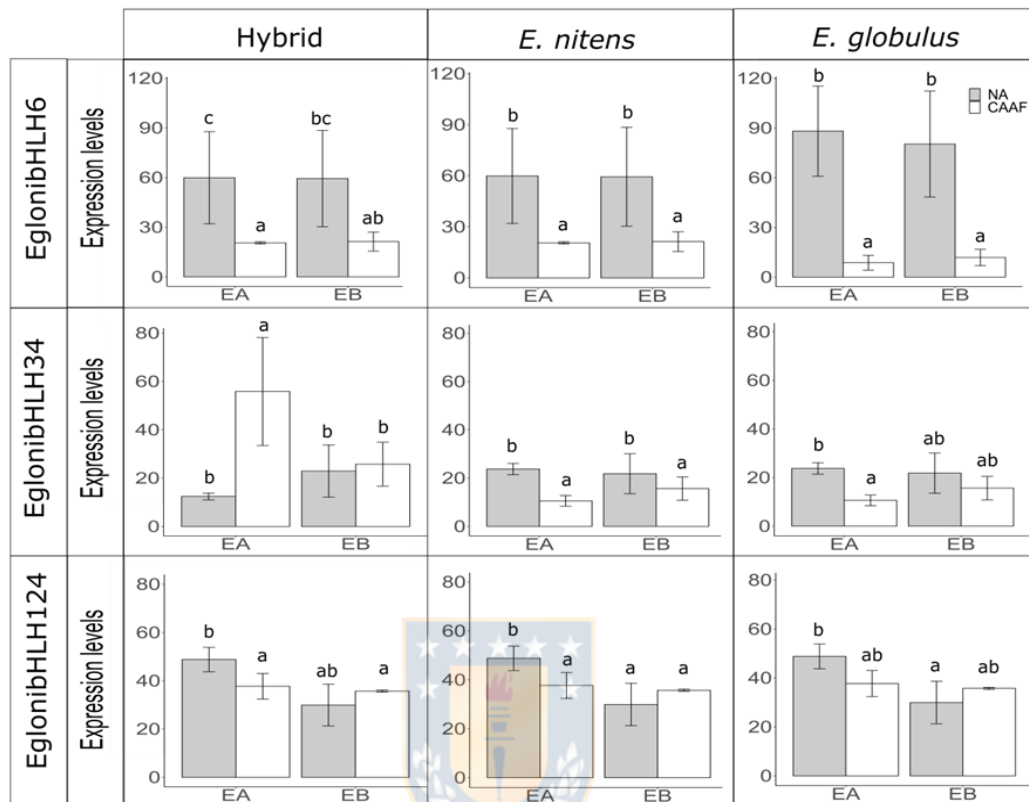
Los resultados de *EglnibHLH6* arrojaron una significativa diferencia entre los tratamientos para el exón A, para el exón B no hay una diferencia estadística, sin embargo las medias para ambos casos son muy similares, además en *E. nitens* y *E. globulus* no se lograron identificar diferencias significativas entre exones. Es importante mencionar que para todos los casos existen diferencias entre condiciones por lo que si bien este gen no parece estar regulado por AS, está evidentemente regulado negativamente por el tratamiento de frío. *EglnibHLH6* es ortólogo al gen *bHLH60* de *A. thaliana*, se ha comprobado que este gen participa en el proceso de floración a través del control de las proteínas DELLA ( Li et al., 2017), sin



embargo esta sería la primera vez que se le asocia participación en el estrés por frío.

En el caso del gen *EglnibHLH34* puede apreciarse claramente una diferencia significativa a nivel de expresión entre EA y EB, EA-CAAF presenta valores de expresión considerablemente mayores, por lo que este exón estaría reteniéndose en condiciones de frío. Algo similar ocurre con *E. nitens*, ya que tiene un comportamiento similar en cuanto al aumento de la expresión en CAAF, sin embargo no presenta diferencias significativas entre exones. *E. globulus* presenta un comportamiento contrario a lo visto con anterioridad ya que la condición NA presenta un mayor nivel de expresión que CAAF, por lo que en ese caso el gen *EglnibHLH34* presenta un comportamiento similar a *E. nitens*. Este gen es ortólogo a *PebHLH35* de *Populus euphratica* donde se identificó que se sobreexpresa como respuesta a los tratamientos de sequía y ácido abscísico (Dong et al., 2014). Al sobreexpresar *PebHLH35* en plantas transgénicas de *A. thaliana* se observó que presentaron una mejor tolerancia a la sequía, reduciendo la apertura estomática, y aumentando la tasa fotosintética y el crecimiento (Dong et al., 2014).

*EglnibHLH124* presenta diferencias significativas entre exones, ya que disminuye su expresión de EA en CAAF, lo mismo puede apreciarse en *E. nitens*. *E. globulus* no presentan diferencias a nivel de exones ni entre tratamientos. *bim2* es el gen ortólogo de *EglnibHLH124* en *A. thaliana*, se ha comprobado que *bim2* promueve la expresión de genes inducidos por brasinoesteroides (Yin et al., 2005). Si bien los brasinoesteroides han sido descritos tradicionalmente como reguladores del crecimiento vegetal (Clouse & Sasse, 1998), existen numerosos estudios en los cuales se les ha asociado una participación en la respuesta al estrés abiótico (Cui et al., 2011; Fariduddin et al., 2014; Kagale et al., 2006) por lo que podrían estar involucrados en la tolerancia al frío (Pociecha et al., 2016).



**Figura 7:** Expresión de exones bHLH correspondientes a tres genes, se evaluaron en *E. nitens x globulus*, *E. nitens* y *E. globulus*. Se evaluaron dos condiciones (NA-CAAF). En el *eje y* se representa el nivel de expresión mientras que en el *eje x* se indica el tipo de exón, EA corresponde al exón variable y EB corresponde al exón que no debería presentar variación (Log2FC cercano a 0).

*EglnibHLH124* es un caso interesante debido a que uno de los exones (EA) disminuye su expresión, lo que da a entender que se está produciendo una isoforma que carece de él. El hecho de que el nivel de expresión de este

exón siga siendo considerable puede deberse al diseño experimental, ya que la condición CAAF consta de heladas nocturnas y una temperatura mayor en el día, lo que podría dar paso a que dos isoformas distintas estén generándose. También es importante considerar que si bien la vida media de un ARN pequeño es baja (Sorenson et al., 2018) como es el caso de un intrón que además está expuesto a nucleasas, cabe la posibilidad de que restos sigan siendo cuantificados mediante qRT-PCR.

La omisión de exón en *EglnibHLH124* no ocasiona un cambio en el marco de lectura ni tampoco afecta al dominio bHLH, solo produciría una proteína de menor tamaño, lo que podría afectar en la especificidad y capacidad de dimerización del factor de transcripción (Hornitschek et al., 2009; Kanaoka et al., 2008), la región fuera del dominio bHLH es muy divergente y contiene motivos que a menudo son desconocidos (Hudson & Hudson, 2015). También cabe la posibilidad de un cambio estructural de la proteína debido a que se pierden 136 aminoácidos y según predicciones de estructuras secundarias (resultados no mostrados) habrían hélices que se pierden. Sin embargo para poder aseverar esto es necesario realizar estudios más profundos a nivel de la proteína traducida y su funcionalidad.

## V. CONCLUSIÓN

Por primera vez se caracterizan sistemáticamente los genes bHLH de *E. grandis*, lo que facilita enormemente futuros estudios de esta familia de TF en *Eucalyptus spp.* También a través del estudio de datos RNA-seq se determinó que existen genes que sufren AS en respuesta al estrés por frío en *E. nitens x globulus*, lo que se corrobora mediante la validación de dos eventos de AS por qRT-PCR. Este trabajo aporta antecedentes de la influencia del AS en los transcritos de genes bHLH, sin embargo aún son necesarios nuevos estudios que permitan evidenciar el AS y la generación de isoformas a nivel de proteínas.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Aguayo, P., Lagos, C., Conejera, D., Medina, D., Fernández, M., & Valenzuela, S. (2019). Transcriptome-wide identification of WRKY family genes and their expression under cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. *Trees*, 33(5), 1313-1327. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01860-3>

Aguayo, P., Sanhueza, J., Noriega, F., Ochoa, M., Lefeuvre, R., Navarrete, D., Fernández, M., & Valenzuela, S. (2016). Overexpression of an SK n-dehydrin gene from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Trees*, 30(5), 1785-1797.

Anders, S., Reyes, A., & Huber, W. (2012). Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Research*, 22(10), 2008-2017. <https://doi.org/10.1101/gr.133744.111>

Atchley, W. R., & Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5172-5176.

Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2015). WRKY proteins: Signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *The Scientific World Journal*, 2015.

Barbazuk, W. B., Fu, Y., & McGinnis, K. M. (2008). Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: Opportunities and challenges. *Genome research*, 18(9), 1381-1392.

Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences*, 32(3), 501-510.

Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *genesis*, 53(8), 474-485.

Buck, M. J., & Atchley, W. R. (2003). Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *Journal of molecular evolution*, 56(6), 742-750.

Butnor, J. R., Johnsen, K. H., Anderson, P. H., Hall, K. B., Halman, J. M., Hawley, G. J., Maier, C. A., & Schaberg, P. G. (2019). Growth, Photosynthesis, and Cold Tolerance of *Eucalyptus benthamii* Planted in the Piedmont of North Carolina. *Forest Science*, 65(1), 59-67. <https://doi.org/10.1093/forsci/fxy030>

Castillon, A., Shen, H., & Huq, E. (2007). Phytochrome interacting factors: Central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in plant science*, 12(11), 514-521.

Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113-116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>

Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S. A., Budworth, P. R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J. A., Harper, J. F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., ... Zhu, T. (2002). Expression Profile Matrix of *Arabidopsis* Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 14(3), 559-574. <https://doi.org/10.1105/tpc.010410>

Clouse, S. D., & Sasse, J. M. (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 427-451. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.427>

Conaf, C. N. F. (2017). Sistema de Informacion Territorial. *Superficies Catastros Usos de Suelos y Recursos Vegetacionales*.

Cui, J.-X., Zhou, Y.-H., Ding, J.-G., Xia, X.-J., Shi, K., Chen, S.-C., Asami, T., Chen, Z., & Yu, J.-Q. (2011). Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber: NO in BR-induced stress tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 34(2), 347-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02248.x>

Dang, C. V., Dolde, C., Gillison, M. L., & Kato, G. J. (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 599-602.

Dong, Y., Wang, C., Han, X., Tang, S., Liu, S., Xia, X., & Yin, W. (2014). A novel bHLH transcription factor PebHLH35 from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 453-458. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.139>

Draeger, L. J., & Mullen, G. P. (1994). Interaction of the bHLH-zip domain of c-Myc with H1-type peptides. Characterization of helicity in the H1 peptides by NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 1785-1793.

Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., & Su, Z. (2010). AgriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research*, 38(suppl\_2), W64-W70.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.



Fairman, R., Beran-Steed, R. K., Anthony-Cahill, S. J., Lear, J. D., Stafford, W. F., DeGrado, W. F., Benfield, P. A., & Brenner, S. L. (1993). Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(22), 10429-10433.

Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I., & Ahmad, A. (2014). Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, *58*(1), 9-17. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0374-5>

Feng, X.-M., Zhao, Q., Zhao, L.-L., Qiao, Y., Xie, X.-B., Li, H.-F., Yao, Y.-X., You, C.-X., & Hao, Y.-J. (2012). The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdCIBHLH1 encodes an ICE-like protein in apple. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 22.

Fernández, M., Troncoso, V., & Valenzuela, S. (2015). Transcriptome profile in response to frost tolerance in *Eucalyptus globulus*. *Plant molecular biology reporter*, *33*(5), 1472-1485.

Fernandez, M., Valenzuela Águila, S., Arora, R., & Chen, K. (2012). Isolation and characterization of three cold acclimation-responsive dehydrin genes from *Eucalyptus globulus*. *Tree Genetics & Genomes*, *8*(1), 149-162. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0429-8>

Fernández, M., Valenzuela, S., Barraza, H., Latorre, J., & Neira, V. (2012). Photoperiod, temperature and water deficit differentially regulate the expression of four dehydrin genes from *Eucalyptus globulus*. *Trees*, *26*(5), 1483-1493. <https://doi.org/10.1007/s00468-012-0722-7>

Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W.-K., & Mockler, T. C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, *20*(1), 45-58. <https://doi.org/10.1101/gr.093302.109>

Floris, M., Mahgoub, H., Lanet, E., Robaglia, C., & Menand, B. (2009). Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International journal of molecular sciences*, *10*(7), 3168-3185.

Foissac, S., & Sammeth, M. (2007). ASTALAVISTA: Dynamic and flexible analysis of alternative splicing events in custom gene datasets. *Nucleic Acids Research*, *35*(Web Server), W297-W299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm311>

Fowler, S., Cook, D., & Thomashow, M. F. (2005). The CBF cold-response pathway. *Plant abiotic stress*, *19*, 71.

Gaete-Loyola, J., Lagos, C., Beltrán, M. F., Valenzuela, S., Emhart, V., & Fernández, M. (2017). Transcriptome profiling of *Eucalyptus nitens* reveals deeper insight into the molecular mechanism of cold acclimation and deacclimation process. *Tree Genetics & Genomes*, *13*(2), 37.

Gusta, L. V., & Wisniewski, M. (2013). Understanding plant cold hardiness: An opinion. *Physiologia Plantarum*, *147*(1), 4-14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01611.x>

Gysling Caselli, A. J., Alvarez González, V., Soto Aguirre, D. A., Pardo, V., & Poblete, P. (2018). *Anuario Forestal 2018*.

Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003). The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular biology and evolution*, *20*(5), 735-747.

Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., & Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *The EMBO Journal*, *28*(24), 3893-3902. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.306>

Hudson, K. A., & Hudson, M. E. (2015). A Classification of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors of Soybean. *International Journal of Genomics*, 2015, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/603182>

Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A., & Shinozaki, K. (2004). Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic acids research*, 32(17), 5096-5103.

Inouye, D. W. (2000). The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecology Letters*, 3(5), 457-463. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00165.x>

Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology*, 5(6), 226.

Kagale, S., Divi, U. K., Krochko, J. E., Keller, W. A., & Krishna, P. (2006). Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta*, 225(2), 353-364. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0361-6>

Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., Zhu, J.-K., & Torii, K. U. (2008). *SCREAM/ICE1* and *SCREAM2* Specify Three Cell-State Transitional Steps Leading to *Arabidopsis* Stomatal Differentiation. *The Plant Cell*, 20(7), 1775-1785. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060848>

Keller, G., Cao, P. B., San Clemente, H., El Kayal, W., Marque, C., & Teulières, C. (2013). Transcript profiling combined with functional annotation of 2,662 ESTs provides a molecular picture of *Eucalyptus gunnii* cold acclimation. *Trees*, 27(6), 1713-1735. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0918-5>

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, *14*(4), R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>

Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(6), 2940-2945. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2940>

Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y., & Iida, H. (2013). Plant mechanosensing and Ca<sup>2+</sup> transport. *Trends in Plant Science*, *18*(4), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.12.002>

Ledent, V., & Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome research*, *11*(5), 754-770.

Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, *47*(W1), W256-W259.

Li, G., Meng, X., Wang, R., Mao, G., Han, L., Liu, Y., & Zhang, S. (2012). Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, *8*(6).

Li, X., Duan, X., Jiang, H., Sun, Y., Tang, Y., Yuan, Z., Guo, J., Liang, W., Chen, L., & Yin, J. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *141*(4), 1167-1184.

Li, Y., Wang, H., Li, X., Liang, G., & Yu, D. (2017). Two DELLA-interacting proteins bHLH48 and bHLH60 regulate flowering under long-day conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 68(11), 2757-2767. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx143>

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>

Lichtenthaler, H. K. (1998). The stress concept in plants: An introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 187-198.

Littlewood, T. D., & Evan, G. I. (1998). *Helix-loop-helix transcription factors*. Oxford University Press, USA.

Liu, Y., Jiang, Y., Lan, J., Zou, Y., & Gao, J. (2014). Comparative transcriptomic analysis of the response to cold acclimation in *Eucalyptus dunnii*. *PloS One*, 9(11), e113091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113091>

Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139-158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>

Mao, K., Dong, Q., Li, C., Liu, C., & Ma, F. (2017). Genome Wide Identification and Characterization of Apple bHLH Transcription Factors and Expression Analysis in Response to Drought and Salt Stress. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00480>

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., & Gonzales, N. R. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*, 45(D1), D200-D203.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Martínez-Gutiérrez, R., Mora-Herrera, M. E., & López-Delgado, H. A. (2012). Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Phytoplasma-Infected Potato Plants Promotes Antioxidant Activity and Tuber Production Under Drought Conditions. *American Journal of Potato Research*, 89(1), 53-62. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9220-5>

Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology*, 20(2), 429-440.

Mastrangelo, A. M., Marone, D., Laidò, G., De Leonardis, A. M., & De Vita, P. (2012). Alternative splicing: Enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. *Plant Science*, 185, 40-49.

Nakashima, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 62-71. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00592.x>

Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*, 5, 170.

Naser, L., Kouros, V., Bahman, K., & Reza, A. (2010). Soluble sugars and proline accumulation play a role as effective indices for drought tolerance screening in Persian walnut (*Juglans regia* L.) during germination. *Fruits*, 65(2), 97-112. <https://doi.org/10.1051/fruits/20010005>

Navarrete-Campos, D., Bravo, L. A., Rubilar, R. A., Emhart, V., & Sanhueza, R. (2013). Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* × *nitens* cuttings. *New Forests*, *44*(1), 119-134.

Nguyen, H. C., Cao, P. B., San Clemente, H., Ployet, R., Mounet, F., Ladouce, N., Harvengt, L., Marque, C., & Teulieres, C. (2017). Special trends in CBF and DREB2 groups in *Eucalyptus gunnii* vs *Eucalyptus grandis* suggest that CBF are master players in the trade-off between growth and stress resistance. *Physiologia plantarum*, *159*(4), 445-467.

Niinemets, Ü. (2010). Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and management*, *260*(10), 1623-1639.

Niu, X., Guan, Y., Chen, S., & Li, H. (2017). Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors in *Brachypodium distachyon*. *BMC genomics*, *18*(1), 619.

Palusa, S. G., Ali, G. S., & Reddy, A. S. (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: Regulation by hormones and stresses. *The Plant Journal*, *49*(6), 1091-1107.

Park, M.-J., Seo, P. J., & Park, C.-M. (2012). CCA1 alternative splicing as a way of linking the circadian clock to temperature response in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, *7*(9), 1194-1196.

Pearce, R. S., & Ashworth, E. N. (1992). Cell shape and localisation of ice in leaves of overwintering wheat during frost stress in the field. *Planta*, *188*(3), 324-331.

Pires, N., & Dolan, L. (2010). Origin and Diversification of Basic-Helix-Loop-Helix Proteins in Plants. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(4), 862-874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp288>

Pires, Nuno, & Dolan, L. (2010). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant signaling & behavior*, 5(7), 911-912.

Pociecha, E., Dziurka, M., Oklestkova, J., & Janeczko, A. (2016). Brassinosteroids increase winter survival of winter rye (*Secale cereale* L.) by affecting photosynthetic capacity and carbohydrate metabolism during the cold acclimation process. *Plant Growth Regulation*, 80(2), 127-135. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0149-z>

Ramsay, N. A., & Glover, B. J. (2005). MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in plant science*, 10(2), 63-70.

Rodríguez-Celma, J., Pan, I., Li, W. D., Lan, P. D., Buckhout, T. J., & Schmidt, W. (2013). The transcriptional response of *Arabidopsis* leaves to Fe deficiency. *Frontiers in plant science*, 4, 276.

Savouré, A., Hua, X.-J., Bertauche, N., Montagu, M. V., & Verbruggen, N. (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(1), 104-109. <https://doi.org/10.1007/s004380050397>

Seo, P. J., Park, M.-J., & Park, C.-M. (2013). Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: Mechanisms and functions. *Planta*, 237(6), 1415-1424.

Severing, E. I., Van Dijk, A. D., Morabito, G., Busscher-Lange, J., Immink, R. G., & van Ham, R. C. (2012). Predicting the impact of alternative splicing on plant MADS domain protein function. *PLoS One*, 7(1).

Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44.



Sorenson, R. S., Deshotel, M. J., Johnson, K., Adler, F. R., & Sieburth, L. E. (2018). *Arabidopsis* mRNA decay landscape arises from specialized RNA decay substrates, decapping-mediated feedback, and redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(7), E1485-E1494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712312115>

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313.

Sun, H., Fan, H.-J., & Ling, H.-Q. (2015). Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. *BMC Genomics*, *16*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12864-014-1209-2>

Swindell, W. R., Huebner, M., & Weber, A. P. (2007). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC genomics*, *8*(1), 125.

Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., & Brown, J. W. (2012). Alternative splicing in plants—coming of age. *Trends in plant science*, *17*(10), 616-623.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.

Teulières, C., Bossinger, G., Moran, G., & Marque, C. (2007). *Stress studies in Eucalyptus*.

Thomashow, M. F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant physiology*, *118*(1), 1-8.

Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual review of plant biology*, *50*(1), 571-599.

Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *The Plant Cell*, *15*(8), 1749-1770. <https://doi.org/10.1105/tpc.013839>

Torres, M., & Rodríguez, S. (1991). Pulpaje kraft con trozas de *Eucalyptus globulus* Labill en diferentes diámetros. *Bosque*, *12*(2), 65-68.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, *7*(3), 562-578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>

Travert, S., Valerio, L., Fouraste, I., Boudet, A. M., & Teulieres, C. (1997). Enrichment in Specific Soluble Sugars of Two Eucalyptus Cell-Suspension Cultures by Various Treatments Enhances Their Frost Tolerance via a Noncolligative Mechanism. *Plant Physiology*, *114*(4), 1433-1442. <https://doi.org/10.1104/pp.114.4.1433>

Turnbull, J. W., & Eldridge, K. G. (1983). The natural environment of Eucalyptus as the basis for selecting frost resistant species. *Proceedings of International Conference on Frost Resistance of Eucalyptus*, 43-62.

Tuteja, N. (2007). Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant signaling & behavior*, *2*(3), 135-138.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115-e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Vian, A., Henry-Vian, C., Schantz, R., Ledoigt, G., Frachisse, J.-M., Desbiez, M.-O., & Julien, J.-L. (1996). Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants? *FEBS Letters*, *380*(1-2), 93-96. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00015-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00015-4)

Vitulo, N., Forcato, C., Carpinelli, E., Telatin, A., Campagna, D., D'Angelo, M., Zimbello, R., Corso, M., Vannozzi, A., Bonghi, C., Lucchin, M., & Valle, G. (2014). A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-99>

Volker, P. W. (1995). Evaluation of *Eucalyptus nitens x globulus* for commercial forestry. *Proc. of the CRCTHF-IUFRO Conf., Hobart, Tasmania*, 19-24.

Walker, D. J., Romero, P., de Hoyos, A., & Correal, E. (2008). Seasonal changes in cold tolerance, water relations and accumulation of cations and compatible solutes in *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany*, *64*(3), 217-224.

Wang, P., Su, L., Gao, H., Jiang, X., Wu, X., Li, Y., Zhang, Q., Wang, Y., & Ren, F. (2018). Genome-Wide Characterization of bHLH Genes in Grape and Analysis of their Potential Relevance to Abiotic Stress Tolerance and Secondary Metabolite Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00064>

Wang, R., Zhao, P., Kong, N., Lu, R., Pei, Y., Huang, C., Ma, H., & Chen, Q. (2018). Genome-Wide Identification and Characterization of the Potato bHLH Transcription Factor Family. *Genes*, *9*(1), 54. <https://doi.org/10.3390/genes9010054>

Wisniewski, M., Bassett, C., & Gusta, L. V. (2003). An Overview of Cold Hardiness in Woody Plants: Seeing the Forest Through the Trees. *HortScience*, *38*(5), 952-959. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.5.952>

Wisniewski, M., Nassuth, A., & Arora, R. (2018). Cold hardiness in trees: A mini-review. *Frontiers in plant science*, *9*, 1394.

Wurzinger, B., Mair, A., Pfister, B., & Teige, M. (2011). Cross-talk of calcium-dependent protein kinase and MAP kinase signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 8-12. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14012>

Xu, W., Jiao, Y., Li, R., Zhang, N., Xiao, D., Ding, X., & Wang, Z. (2014). Chinese wild-growing *Vitis amurensis* ICE1 and ICE2 encode MYC-type bHLH transcription activators that regulate cold tolerance in Arabidopsis. *PloS one*, 9(7).

Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., Cheng, Y., Xu, H., Huang, X., Li, S., & Zhou, A. (2018). WEGO 2.0: A web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic acids research*, 46(W1), W71-W75.

Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2005). A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 120(2), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.044>

Zhu, G., Li, W., Zhang, F., & Guo, W. (2018). RNA-seq analysis reveals alternative splicing under salt stress in cotton, *Gossypium davidsonii*. *BMC Genomics*, 19(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4449-8>



Anexo 1: Estructura de genes EgrbHLH y ubicación de motivos identificados. En A se observa la relación filogenética de los genes. En B se aprecia la estructura intrón –exón de los genes. En C se observan los motivos identificados y sus ubicaciones (tabla 1).

## Anexo 2: Alineamiento de genes duplicados

Query	Target	E-valor	Identidad (%)	Cobertura	Grupo
Eucgr.B00713.1	Eucgr.E00019.1	0.0	91,734	100	1
Eucgr.B01225.1	Eucgr.B01226.1	3.10e-108	88,571	81	2
Eucgr.E00019.1	Eucgr.B00713.1	0.0	91,734	74	1
Eucgr.E01039.1	Eucgr.E01043.1	0.0	87,66	86	3
Eucgr.E01039.1	Eucgr.E01043.1	3.29e-123	85,577	86	3
Eucgr.E01042.1	Eucgr.E01049.1	0.0	87,288	99	3
Eucgr.E01042.1	Eucgr.E01049.1	0.0	86,601	99	3
Eucgr.E01042.1	Eucgr.E01045.1	1.62e-180	85,787	98	3
Eucgr.E01042.1	Eucgr.E01045.1	0.0	83,121	98	3
Eucgr.E01043.1	Eucgr.E01039.1	0.0	87,66	90	3
Eucgr.E01043.1	Eucgr.E01039.1	3.17e-123	85,577	90	3
Eucgr.E01045.1	Eucgr.E01042.1	1.68e-180	85,787	95	3
Eucgr.E01045.1	Eucgr.E01049.1	0.0	83,959	99	3
Eucgr.E01045.1	Eucgr.E01042.1	0.0	83,121	95	3
Eucgr.E01045.1	Eucgr.E01047.1	0.0	82,781	99	3
Eucgr.E01046.1	Eucgr.E01047.1	9.88e-18	97,917	99	3
Eucgr.E01046.1	Eucgr.E01047.1	0.0	95,041	99	3
Eucgr.E01046.1	Eucgr.E01047.1	0.0	93,384	99	3
Eucgr.E01047.1	Eucgr.E01046.1	1.25e-17	97,917	78	3
Eucgr.E01047.1	Eucgr.E01046.1	0.0	95,041	78	3
Eucgr.E01047.1	Eucgr.E01046.1	0.0	93,384	78	3
Eucgr.E01047.1	Eucgr.E01045.1	0.0	82,794	99	3
Eucgr.E01047.1	Eucgr.E01049.1	0.0	81,565	100	3
Eucgr.E01049.1	Eucgr.E01042.1	0.0	87,288	87	3
Eucgr.E01049.1	Eucgr.E01042.1	0.0	86,601	87	3
Eucgr.E01049.1	Eucgr.E01045.1	0.0	83,959	91	3
Eucgr.E01049.1	Eucgr.E01047.1	0.0	81,552	91	3
Eucgr.E03270.1	Eucgr.E03271.1	0.0	88,029	80	4
Eucgr.E03270.1	Eucgr.E03272.1	0.0	86,971	87	4

Eucgr.E03270.1	Eucgr.E03273.1	1.84e-152	86,639	71	4
Eucgr.E03273.1	Eucgr.E03272.1	0.0	97,308	100	4
Eucgr.E03273.1	Eucgr.E03270.1	1.31e-152	86,639	99	4
Eucgr.E03273.1	Eucgr.E03271.1	6.08e-151	86,458	99	4
Eucgr.E04247.1	Eucgr.E04246.1	1.53e-109	77,714	75	5
Eucgr.H00196.1	Eucgr.J01563.1	0.0	96,125	89	6
Eucgr.H01682.1	Eucgr.H02048.1	0.0	98,573	100	7
Eucgr.H02048.1	Eucgr.H01682.1	0.0	98,573	100	7
Eucgr.H02385.1	Eucgr.H02386.1	6.53e-142	83,063	84	8
Eucgr.H02389.1	Eucgr.H02391.1	0.0	83,446	90	8
Eucgr.H02390.1	Eucgr.H02389.1	0.0	95,513	86	8
Eucgr.H02390.1	Eucgr.H02391.1	3.22e-170	86,754	73	8
Eucgr.H02391.1	Eucgr.H02389.1	0.0	83,483	95	8
Eucgr.H02396.1	Eucgr.H02398.1	0.0	88,565	100	8
Eucgr.H02398.1	Eucgr.H02396.1	0.0	88,565	100	8
Eucgr.J01563.1	Eucgr.H00196.1	0.0	96,125	91	6
Eucgr.K01037.1	Eucgr.K01039.1	0.0	89,958	99	9
Eucgr.K01037.1	Eucgr.K01038.1	0.0	89,212	99	9
Eucgr.K01038.1	Eucgr.K01037.1	0.0	89,212	71	9
Eucgr.K01038.1	Eucgr.K01039.1	0.0	87,394	93	9
Eucgr.K01039.1	Eucgr.K01037.1	0.0	89,958	74	9
Eucgr.K01039.1	Eucgr.K01038.1	0.0	87,394	97	9
Eucgr.K02849.1	Eucgr.K02855.1	0.0	89,68	97	10
Eucgr.K02849.1	Eucgr.K02854.1	0.0	89,68	97	10
Eucgr.K02849.1	Eucgr.K02851.1	0.0	87,389	97	10
Eucgr.K02851.1	Eucgr.K02854.1	0.0	94,504	100	10
Eucgr.K02851.1	Eucgr.K02855.1	0.0	94,306	99	10
Eucgr.K02851.1	Eucgr.K02849.1	0.0	87,389	99	10
Eucgr.K02854.1	Eucgr.K02855.1	0.0	98,577	99	10
Eucgr.K02854.1	Eucgr.K02851.1	0.0	94,504	100	10
Eucgr.K02854.1	Eucgr.K02849.1	0.0	89,68	99	10
Eucgr.K02855.1	Eucgr.K02854.1	0.0	98,577	99	10
Eucgr.K02855.1	Eucgr.K02851.1	0.0	94,306	99	10
Eucgr.K02855.1	Eucgr.K02849.1	0.0	89,68	99	10

Anexo 3: Número de genes EgrbHLH y número de intrones en cada grupo filogenético.

Group	EgrbHLHs	Number of intron										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	18						4	6	6	2		
B	15	5	2			3	3	1	1			
C	8				1		3	2	1		1	
D	15		6		1	1		3	3	1		
E	7			1		1	1	1			2	1
F	3							1	1			1
G	7		7									
H	13				9	1	2			1		
I	10			3	6	1						
J	26	7	4	4		4		3	4			
K	10		1	8	1							
L	1			1								
M	3			3								
N	4		1	2	1							
O	13			11	2							



Anexo 4: Log<sub>2</sub>FC de exones bHLH expresados diferencialmente

<b>bHLH:Exon</b>	<b>Gene ID</b>	<b>NA_CABF</b>	<b>NA_CAAF</b>	<b>CABF_CAAF</b>
Eucgr.A00213:E001	Eucgr.A00213	0,08	-0,73	-0,83
Eucgr.A00213:E002	Eucgr.A00213	-0,14	-0,80	-0,69
Eucgr.A00213:E003	Eucgr.A00213	-0,13	-0,14	-0,02
Eucgr.A00213:E008	Eucgr.A00213	0,25	0,31	0,03
Eucgr.A00998:E002	Eucgr.A00998	0,17	0,36	0,16
Eucgr.A00998:E003	Eucgr.A00998	0,09	0,27	0,15
Eucgr.A00998:E004	Eucgr.A00998	-0,05	-0,01	0,01
Eucgr.A00998:E005	Eucgr.A00998	-0,02	-0,49	-0,50
Eucgr.A00998:E006	Eucgr.A00998	-0,98	-3,08	-2,13
Eucgr.A02043:E002	Eucgr.A02043	-0,08	0,40	0,51
Eucgr.A02043:E003	Eucgr.A02043	-0,03	0,23	0,30
Eucgr.A02043:E004	Eucgr.A02043	-0,04	0,18	0,27
Eucgr.A02043:E007	Eucgr.A02043	-0,01	-0,22	-0,17
Eucgr.A02043:E008	Eucgr.A02043	-0,06	-0,96	-0,84
Eucgr.A02043:E011	Eucgr.A02043	0,68	0,87	0,24
Eucgr.A02043:E015	Eucgr.A02043	0,01	0,19	0,22
Eucgr.A02413:E001	Eucgr.A02413	0,12	0,22	0,10
Eucgr.A02413:E002	Eucgr.A02413	0,46	0,62	0,15
Eucgr.A02413:E005	Eucgr.A02413	-0,17	-0,40	-0,22
Eucgr.A02413:E006	Eucgr.A02413	-0,46	-1,18	-0,73
Eucgr.A02413:E007	Eucgr.A02413	-1,05	-1,60	-0,53
Eucgr.A02413:E009	Eucgr.A02413	-0,87	-1,95	-1,04
Eucgr.A02413:E010	Eucgr.A02413	-1,06	-3,05	-1,98
Eucgr.B00385:E003	Eucgr.B00385	0,21	0,28	0,08
Eucgr.B00385:E004	Eucgr.B00385	-0,16	-0,58	-0,41
Eucgr.B00385:E005	Eucgr.B00385	-0,18	-0,45	-0,29
Eucgr.B00470:E002	Eucgr.B00470	0,01	0,41	0,40
Eucgr.B00470:E004	Eucgr.B00470	-0,14	-0,66	-0,52
Eucgr.B00645:E001	Eucgr.B00645	0,11	0,26	0,13
Eucgr.B00645:E010	Eucgr.B00645	-0,10	-0,82	-0,73
Eucgr.B00645:E011	Eucgr.B00645	-0,30	-2,05	-1,77
Eucgr.B00645:E012	Eucgr.B00645	-0,15	-1,14	-0,99
Eucgr.B01487:E001	Eucgr.B01487	-0,29	-0,44	-0,15
Eucgr.B01487:E006	Eucgr.B01487	0,86	0,72	-0,14

Eucgr.B01487:E007	Eucgr.B01487	-0,23	-0,61	-0,39
Eucgr.B03106:E007	Eucgr.B03106	-0,05	-0,33	-0,30
Eucgr.B03106:E008	Eucgr.B03106	-0,10	-0,57	-0,48
Eucgr.B03113:E001	Eucgr.B03113	-0,18	-0,54	-0,38
Eucgr.B03113:E003	Eucgr.B03113	0,00	0,21	0,20
Eucgr.B03113:E005	Eucgr.B03113	0,14	0,20	0,05
Eucgr.B03669:E001	Eucgr.B03669	-0,02	0,14	0,17
Eucgr.B03669:E005	Eucgr.B03669	0,01	-0,30	-0,29
Eucgr.B03669:E006	Eucgr.B03669	-0,13	-0,78	-0,63
Eucgr.B03669:E007	Eucgr.B03669	-0,35	-3,21	-2,85
Eucgr.B03816:E001	Eucgr.B03816	-0,32	-0,83	-0,54
Eucgr.B03816:E006	Eucgr.B03816	0,03	0,29	0,24
Eucgr.B03816:E010	Eucgr.B03816	0,00	-0,36	-0,38
Eucgr.C00105:E002	Eucgr.C00105	-0,09	-0,81	-0,70
Eucgr.C00105:E003	Eucgr.C00105	-0,10	-0,35	-0,24
Eucgr.C00105:E004	Eucgr.C00105	0,03	0,31	0,30
Eucgr.C00105:E005	Eucgr.C00105	0,00	-0,16	-0,14
Eucgr.C00105:E006	Eucgr.C00105	0,06	0,18	0,14
Eucgr.C02208:E006	Eucgr.C02208	0,07	0,68	0,59
Eucgr.C03807:E004	Eucgr.C03807	0,03	-0,25	-0,28
Eucgr.C03807:E005	Eucgr.C03807	-0,08	-0,19	-0,11
Eucgr.C03807:E009	Eucgr.C03807	0,08	0,23	0,15
Eucgr.D02499:E001	Eucgr.D02499	0,13	0,81	0,77
Eucgr.D02499:E002	Eucgr.D02499	-0,09	-1,19	-0,99
Eucgr.D02499:E003	Eucgr.D02499	-0,14	-0,26	-0,06
Eucgr.E00047:E001	Eucgr.E00047	-0,15	-0,53	-0,34
Eucgr.E00047:E002	Eucgr.E00047	0,03	0,05	0,06
Eucgr.E03271:E001	Eucgr.E03271	0,00	0,62	0,68
Eucgr.E03271:E003	Eucgr.E03271	-0,17	-0,81	-0,58
Eucgr.E03614:E001	Eucgr.E03614	-0,01	0,37	0,35
Eucgr.E03614:E005	Eucgr.E03614	-0,08	-0,38	-0,31
Eucgr.E03614:E006	Eucgr.E03614	-0,11	-0,36	-0,30
Eucgr.F01868:E003	Eucgr.F01868	-0,10	-0,34	-0,24
Eucgr.F02171:E001	Eucgr.F02171	0,05	0,33	0,22
Eucgr.F02171:E004	Eucgr.F02171	0,11	-0,53	-0,69
Eucgr.F02220:E001	Eucgr.F02220	0,06	0,18	0,14
Eucgr.F02220:E006	Eucgr.F02220	0,03	-0,54	-0,56

Eucgr.F02220:E008	Eucgr.F02220	-0,19	-0,78	-0,58
Eucgr.F02220:E009	Eucgr.F02220	-0,04	-0,33	-0,27
Eucgr.F02309:E007	Eucgr.F02309	-0,66	-1,86	-1,22
Eucgr.F03049:E006	Eucgr.F03049	-0,23	-0,44	-0,21
Eucgr.F03093:E001	Eucgr.F03093	0,01	-0,29	-0,29
Eucgr.F03093:E002	Eucgr.F03093	-0,01	0,34	0,36
Eucgr.F03420:E002	Eucgr.F03420	-0,21	-0,85	-0,73
Eucgr.F03420:E007	Eucgr.F03420	0,35	0,63	0,19
Eucgr.F03420:E008	Eucgr.F03420	0,25	0,40	0,07
Eucgr.F03420:E010	Eucgr.F03420	0,09	0,22	0,05
Eucgr.F03420:E012	Eucgr.F03420	0,86	0,93	-0,02
Eucgr.G01757:E002	Eucgr.G01757	0,05	0,41	0,38
Eucgr.G01757:E006	Eucgr.G01757	-0,23	-1,46	-1,21
Eucgr.G01783:E008	Eucgr.G01783	-0,06	-1,31	-1,24
Eucgr.G01938:E001	Eucgr.G01938	0,11	0,47	0,31
Eucgr.G01938:E002	Eucgr.G01938	-0,01	-0,15	-0,18
Eucgr.G03396:E002	Eucgr.G03396	-0,06	0,32	0,38
Eucgr.G03396:E005	Eucgr.G03396	0,04	-0,26	-0,29
Eucgr.G03396:E008	Eucgr.G03396	0,07	0,41	0,32
Eucgr.H00174:E004	Eucgr.H00174	0,06	0,19	0,15
Eucgr.H00748:E003	Eucgr.H00748	-0,29	-1,01	-0,67
Eucgr.H00748:E005	Eucgr.H00748	-0,16	-0,93	-0,73
Eucgr.H00748:E007	Eucgr.H00748	0,20	0,52	0,36
Eucgr.H00748:E010	Eucgr.H00748	-0,11	0,52	0,67
Eucgr.H01487:E001	Eucgr.H01487	-0,30	-0,72	-0,40
Eucgr.H01487:E007	Eucgr.H01487	-0,02	-0,11	-0,08
Eucgr.H01487:E009	Eucgr.H01487	0,00	0,49	0,51
Eucgr.H02628:E009	Eucgr.H02628	-0,02	0,21	0,24
Eucgr.H02788:E001	Eucgr.H02788	-0,01	0,52	0,69
Eucgr.H02788:E002	Eucgr.H02788	-0,10	-0,63	-0,37
Eucgr.H04468:E001	Eucgr.H04468	0,01	0,54	0,59
Eucgr.I00608:E005	Eucgr.I00608	0,09	1,01	0,96
Eucgr.I02069:E002	Eucgr.I02069	-0,86	-2,89	-2,02
Eucgr.I02069:E003	Eucgr.I02069	-0,36	-0,74	-0,36
Eucgr.I02069:E007	Eucgr.I02069	2,53	2,15	-0,38
Eucgr.I02069:E009	Eucgr.I02069	0,10	0,23	0,13
Eucgr.I02346:E001	Eucgr.I02346	-0,39	-1,29	-0,81

Eucgr.I02346:E003	Eucgr.I02346	-0,14	-0,80	-0,59
Eucgr.I02346:E005	Eucgr.I02346	-0,11	-0,22	-0,04
Eucgr.I02346:E006	Eucgr.I02346	0,33	0,55	0,28
Eucgr.I02518:E003	Eucgr.I02518	-0,06	-0,31	-0,31
Eucgr.J00190:E001	Eucgr.J00190	0,03	-0,70	-0,64
Eucgr.J00190:E002	Eucgr.J00190	-0,02	0,28	0,43
Eucgr.J00573:E005	Eucgr.J00573	-0,46	-0,87	-0,41
Eucgr.J00573:E006	Eucgr.J00573	-0,05	-0,22	-0,16
Eucgr.J00573:E008	Eucgr.J00573	0,07	0,29	0,21
Eucgr.J00796:E002	Eucgr.J00796	-0,32	-0,68	-0,39
Eucgr.J00796:E003	Eucgr.J00796	-0,32	-0,66	-0,36
Eucgr.J00796:E007	Eucgr.J00796	0,60	0,73	0,13
Eucgr.J00796:E009	Eucgr.J00796	0,14	0,33	0,17
Eucgr.K02229:E007	Eucgr.K02229	-0,40	-1,10	-0,65
Eucgr.K02496:E002	Eucgr.K02496	-0,03	-0,99	-0,93
Eucgr.K02496:E005	Eucgr.K02496	-0,08	-0,30	-0,22
Eucgr.K02496:E006	Eucgr.K02496	-0,02	0,53	0,55
Eucgr.K03270:E001	Eucgr.K03270	-0,27	-0,74	-0,48
Eucgr.K03270:E002	Eucgr.K03270	-0,14	-0,19	-0,10
Eucgr.K03270:E004	Eucgr.K03270	-0,18	-0,20	-0,06
Eucgr.K03270:E005	Eucgr.K03270	-0,23	-0,20	0,00
Eucgr.K03270:E007	Eucgr.K03270	-0,01	0,10	0,08
Eucgr.K03270:E008	Eucgr.K03270	-0,08	-0,42	-0,36
Eucgr.K03270:E011	Eucgr.K03270	0,35	0,48	0,11
Eucgr.K03293:E001	Eucgr.K03293	0,03	0,19	0,16
Eucgr.K03293:E002	Eucgr.K03293	-0,01	-0,07	-0,05
Eucgr.K03592:E001	Eucgr.K03592	-0,06	-1,32	-1,36
Eucgr.K03592:E002	Eucgr.K03592	-0,16	-1,30	-1,15
Eucgr.K03592:E008	Eucgr.K03592	-0,07	0,16	0,22
Eucgr.L00002:E002	Eucgr.L00002	0,08	0,28	0,20
Eucgr.L00002:E005	Eucgr.L00002	-0,01	-0,88	-0,87

Anexo 5: Información de los partidores diseñados.

<b>GEN</b>	<b>EXON</b>	<b>EXPRESION</b>	<b>logFC (NA- CAAF)</b>	<b>LEFT</b>	<b>RIGHT</b>	<b>SIZE AMP</b>
EglonibHLH6	E009	VARIABLE (EA)	-1,95	TATGGCTATCGGT GGCTTG	AAGAACGAGAGCTCGGAA GA	82
EglonibHLH124	E002	VARIABLE (EA)	-2,89	ACAAGCGCTGTTC AAAAATG	AATCCAACCCAATCCAAC AC	141
EglonibHLH34	E006	VARIABLE (EA)	0,68	GAACATGGTCGTC TCCAAT	CGGAAAAGAAAAACCCAC AA	78
EglonibHLH6	E004	CONTROL (EB)	-0,03	TGGCGTTGTAAAG ATTGCAC	GCTTCGGTGTGGATGAA AT	50
EglonibHLH124	E004	CONTROL (EB)	0,00	ACAAGCGCTGTTC AAAAATG	AATCCAACCCAATCCAAC AC	141
EglonibHLH34	E005	CONTROL (EB)	-0,05	TGACAACAGACG CACACAGA	TGATCGAATGGCATGAGA AA	86