

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAGISTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA



**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y COMPARATIVO DE GENES
DE SÍNTESIS DE CUTÍCULA EN ACLIMATACIÓN A ESTRÉS
POR BAJAS TEMPERATURAS EN *EUCALYPTUS SPP.***

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA

Por: DANIEL ALEJANDRO CONEJERA ALBORNOZ

Profesora Guía: DRA. MARTA FERNANDEZ

Concepción, Chile 2023

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y COMPARATIVO DE GENES DE SÍNTESIS DE CUTÍCULA EN ACLIMATACIÓN A ESTRÉS POR BAJAS TEMPERATURAS EN *EUCALYPTUS SPP.*

Profesora Guía

Marta Fernández Reyes
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Profesora Co-Guía

Estefanía Tarifeño Saldivia
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Evaluadora Externa



Sofía Valenzuela Águila
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Evaluadora interna

Elena Uribe Pérez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Evaluadora interna

Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director(S) del Programa

José Martínez Oyanedel
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDO

CAITULO I. INTRODUCCION.....	1
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	14
2.1 Hipótesis.....	14
2.2 Objetivo general.....	15
3.3 Objetivos específicos:.....	15
III. METODOLOGIA.....	16
3.1 Material vegetal y datos RNAseq.....	16
3.2 Control de calidad, ensamble de <i>novo</i> y anotación de transcriptomas.....	18
3.3 Análisis de expresión diferencial.....	20
3.4 Identificación de genes cuticulares.....	21
3.5 Gene Ontology.....	22
3.6 Evaluar interacción proteína - proteína.....	23
3.8 Selección de genes cuticulares.....	24
3.9 Validación de genes diferencialmente expresados por qPCR.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
4.1 Pre-procesamiento, ensamble y anotación de transcriptomas.....	26
4.2 Expresión diferencial de transcriptomas <i>Eucalyptus spp.</i>	28
4.3 Identificación de genes cuticulares.....	31
4.4 Validación por qPCR de genes expresados diferencialmente en <i>Eucalyptus spp.</i>	34
4.5 Impacto del frío en la expresión génica asociados a cutícula.....	47
4.6 Red de regulación génica de síntesis cuticular.....	51
CONCLUSION.....	54
VI. BIBLIOGRAFIA.....	55
VII. ANEXO.....	74
.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Composición química de cutícula por FT-IR en <i>Eucalyptus spp</i>	8
TABLA 2. Resumen ensamble de transcriptomas en <i>Eucalyptus spp</i>	25
TABLA 3. Análisis comparativo de expresión diferencial entre EdgeR, DESeq2 y NOISeqBIO en los 3 genotipos en estudio	33

En el anexo:

ANEXO 1: Valores de LT50, condición NA, ADH, AAH en <i>Eucalyptus spp</i>	70
ANEXO 3. Mapping entre bibliotecas de <i>E.globulus</i> , <i>E. nitens</i> e híbrido. Condición: NA, ADH, AAH.....	72
ANEXO 4. Dominios funcionales en reportados por Pfam	73
ANEXO 5. Dominios funcionales reportados para genotipos de <i>Eucalyptus spp</i>	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Biosíntesis de cutina y ceras cuticulares	12
FIGURA 2. Perfil de aclimatación para estrés por bajas temperaturas NA, ADH, AAH	17
FIGURA 3. Análisis de componentes principales de librerías <i>E. nitens</i>	27
FIGURA 4. Diagrama de Venn entre transcriptomas de <i>Eucalyptus spp</i> y genes expresados diferencialmente.....	30
FIGURA 5. Acumulación de transcritos mediante qPCR de genes de síntesis cuticular, en <i>Eucalyptus spp</i>	33
FIGURA 6. Análisis de Gene ontology por proceso biológico de 188 proteínas de síntesis cuticular	45
FIGURA 7. Red de regulación génica de 188 proteínas expresadas diferencialmente en la condición ADH	47
En el anexo:	
ANEXO 2. Porcentaje de supervivencia de plantas <i>Eucalyptus spp</i>	71
ANEXO 6. GO de transcriptoma completo expresado diferencialmente en ADH para híbrido.....	75
ANEXO 7. GO de transcriptoma completo expresado diferencialmente en ADH para <i>E. globulus</i>	76
ANEXO 8. GO de transcriptoma completo expresado diferencialmente en ADH para <i>E. nitens</i>	77
ANEXO 9. Heatmap de 188 proteínas expresadas diferencialmente en ADH para <i>Eucalyptus spp</i>	78

Resumen

Eucalyptus globulus y *Eucalyptus nitens* tienen un gran impacto en la industria forestal y maderera en Chile, principalmente por su calidad de fibra y alta tasa de crecimiento. Sin embargo, una de las principales limitaciones para *E. globulus* es la sensibilidad a condiciones a bajas temperaturas y sequía prolongada, en comparación a *E. nitens* que tiene capacidad de tolerar condiciones de bajas temperaturas. A raíz de esto, se han generado diversos enfoques para determinar la capacidad genética respecto a la tolerancia a bajas temperaturas entre estas dos especies y un híbrido (*Eucalyptus globulus* x *Eucalyptus nitens*), una de ellas a través de Espectroscopia infrarroja (FT-IR), donde se ha establecido diferencias en la composición química de la cutícula, evidenciando una similitud entre individuos tolerantes (*E. nitens* e híbrido) y sensibles (*E. globulus*) en respuesta a tratamientos de congelación.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los perfiles transcriptómicos de genes que participan en la biosíntesis de cutícula relacionados con tratamientos de aclimatación después de helada (ADH) y control (NA) en tres genotipos de *Eucalyptus spp.* Se evaluó la expresión diferencial de genes implicados en la síntesis y regulación de la síntesis de cutícula, lo que permitió establecer un total de 422 genes anotados con *E. grandis* como referencia, los que corresponden a 188 de *A. thaliana*. Los cuales corresponden a 54 factores de transcripción y 134 genes obtenidos por literatura y bases de datos de síntesis cuticular. Además se evaluó por qPCR 8 proteínas que participan en la red de regulación de la síntesis de cutícula que permitió establecer diferencias entre genotipos tolerantes y sensibles implicadas en estrés por bajas temperaturas en tejido foliar de *Eucalyptus spp.*

Abstract

Eucalyptus globulus and *Eucalyptus nitens* have a great impact on the forestry and timber industry in Chile, mainly due to their fiber quality and high growth rate. However, one of the main limitations for *E. globulus* is its sensitivity to low temperature conditions and prolonged drought, compared to *E. nitens*, which has the ability to tolerate low temperature conditions. As a result of this, various approaches have been generated to determine the genetic capacity regarding tolerance to low temperatures between these two species and a hybrid (*Eucalyptus globulus* x *Eucalyptus nitens*), one of them through infrared spectroscopy (FT-IR), where differences in the chemical composition of the cuticle have been established, evidencing a similarity between tolerant (*E. nitens* and hybrid) and sensitive (*E. globulus*) individuals in response to freezing treatments.

The objective of this work is to evaluate the transcriptomic profiles of genes involved in cuticle biosynthesis related to acclimatization treatments after frost (ADH) and control (NA) in three *Eucalyptus spp.* genotypes. The differential expression of genes involved in the synthesis and regulation of cuticle synthesis was evaluated, which allowed establishing a total of 422 genes annotated with *E. grandis* as reference, corresponding to 188 of *A. thaliana*. Which correspond to 54 transcription factors and 134 genes obtained by literature and cuticular synthesis databases. In addition, 8 proteins that participate in the cuticle synthesis regulation network were evaluated by qPCR, which allowed establishing differences between tolerant and sensitive genotypes involved in low temperature stress in *Eucalyptus spp.*

I. INTRODUCCION

Importancia y características del género *Eucalyptus*

Eucalyptus sp. es uno de los géneros de árboles latifoliadas más plantado a nivel mundial, debido a que posee una gran plasticidad fenotípica y diversidad de especies que le permite establecerse en zonas tropicales, subtropicales y en zonas templadas (Bryant and Trueman, 2015; Grattapaglia *et al.*, 2012; Teulières *et al.*, 2012). Además, presenta un rápido crecimiento, el cual es aprovechado para ser utilizado como madera para pulpaje y como madera aserrada (Kube *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2005; Teulières *et al.*, 2012.; Trincado V *et al.*, 2003).

En cuanto a la industria forestal y maderera en Chile, ésta tiene un gran impacto en la economía, ya que según datos del año 2019, la superficie de plantación fue de alrededor de 2,3 millones de hectáreas (concentradas principalmente en la región del Biobío), donde predominan las plantaciones de especies *Pinus radiata* D. Don, *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden, siendo estas dos últimas las que representan el 36,8% del total de hectáreas plantadas, utilizándose principalmente para la extracción de pulpa para la industria de la celulosa destinado en su mayoría a la exportación (INFOR, 2021).

Ambas especies del género *Eucalyptus sp.* corresponden botánicamente a la clase Angiospermas, subclase Dicotiledóneas y la familia *Myrtaceae*. En este género existen más de 500 especies originarias de Australia (Prado y Barros, 1989), de las cuales en Chile estas especies presentan una alta tasa

de crecimiento, una susceptibilidad al déficit hídrico y una distribución que abarca desde climas costeros a montañosos. Por una parte, *E. nitens* presenta cualidades que constituyen una excelente alternativa dada las buenas características en cuanto a parámetros de calidad de madera, con una tasa de crecimiento entre 14-77 m³/ha/año (Ipinza *et al.*, 2014) y una densidad que varía entre 360-570 kg/m³ (Kube *et al.*, 2001) todo esto modelado por las condiciones de sitio y edad de las plantas. Además presenta la capacidad de tolerar climas más frío en comparación a *E. globulus* (Battaglia *et al.*, 1996; Close, 2001), lo cual lo convierte en una especie apta para la forestación especialmente para zonas sobre los 800 msnm, utilizándose principalmente como madera pulpable (de Santana Costa *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2005; White, 1996). Por otra parte, *E. globulus* tiene cualidades excepcionales, principalmente por su calidad de fibra, donde se ha establecido una tasa de crecimiento entre 13 a 46 m³/ha/año y una densidad que varía entre 490 a 600 kg/ m³ (Miranda *et al.*, 2001), para lo cual se utiliza como pulpage en la industria de la celulosa y como madera aserrada (Baltierra *et al.*, 2013; Espina, 2006; INFOR, 2021). Sin embargo, una de las principales limitaciones es la susceptibilidad a sequía prolongada y condiciones a bajas temperaturas debido a que exhibe yemas desnudas y la ausencia de un periodo de dormancia vegetativa en invierno que se acentúa en los primeros años de crecimiento, lo cual obliga a ser plantado en regiones con climas templados y con una baja altitud, limitando su distribución geográficas en estas zonas (Espina, 2006; Ipinza *et al.*, 2014; White, 1996). Además se ha evidenciado que esta especie puede soportar hasta -6°C, comenzando a sufrir daño celular desde los -3°C

(Ipinza *et al.*, 2014), al igual que Arias en (2014) demostró que la temperatura letal en la que el 50% de los tejidos son dañados (LT_{50}) corresponde a -3°C en comparación a *E. nitens* que tiene un LT_{50} de -5.5°C demostrando que esta última especie tiene una mayor tolerancia a condiciones de baja temperatura. Es por ello, que en los últimos años se ha buscado la complementariedad de las características de crecimiento y tolerancia al frío de *E. nitens* con la alta calidad de madera para pulpa de *E. globulus* a través de mejoramientos tradicionales con la finalidad de generar varios cruzamientos entre estas especies para producir híbridos que puedan combinar estas características y obtener individuos superiores en cuanto a calidad, crecimiento y tolerancia al frío (Ipinza *et al.*, 2014).

2.2 Condiciones de estrés abiótico presentes que afectan a *Eucalyptus*

El incremento actual de la temperatura global causado por actividades antropogénicas dan como resultado una alteración progresiva del clima en muchos ecosistemas, reflejándose en un aumento de las perturbaciones climáticas como temperaturas extremas, heladas repentinas, severidad y duración de los períodos de sequía que afectan las áreas forestales, los cuales disminuyen el rendimiento y aumenta la mortalidad de los árboles debido al estrés sometido en las plantaciones (Allen *et al.*, 2010, 2015; Rubilar *et al.*, 2018). Por ende, el estrés es cualquier perturbación adversa ocasionada por una causa externa que afecta el metabolismo, crecimiento y desarrollo del individuo (Lichtenthaler, 1998), que por lo general desencadena respuestas bioquímicas y/o fisiológicas para mantener las funciones vitales de la planta, ya que no poseen sistemas de

termorregulación (Taiz and Zeiger, 2006). Por esta razón, es necesario identificar los mecanismos involucrados que confieren tolerancia al estrés abiótico y cómo las especies arbóreas se adaptan al cambio climático para mantener y/o aumentar la productividad y garantizar la disponibilidad de recursos en el futuro (Harfouche *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, varios estudios se han centrado en comprender cómo el estrés abiótico, principalmente la sequía y las bajas temperaturas, afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, que conllevan a una serie de cambios bioquímicos, morfo-fisiológicos y moleculares que experimentan como parte de la respuesta al estrés ambiental en *Eucalyptus*. (Navarrete-Campos *et al.*, 2012; Keller *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2015; Aguayo *et al.*, 2016, 2019; Gaete-Loyola *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017; Butnor *et al.*, 2019).

Se ha establecido que las plantas promueven una maquinaria para responder a las heladas, que se constituye por mecanismos de evasión y tolerancia. El primero corresponde a evitar el contacto directo de sus tejidos a bajas temperaturas, como por ejemplo a través de la dormancia en periodo invernal. Por otra parte, el mecanismo de tolerancia (presente en *E. globulus* y *E. nitens*) corresponde a procesos que soportan la formación de hielo en los tejidos vegetales pero sin generar consecuencias letales para los individuos (Moraga *et al.*, 2006). Esta tolerancia es determinada por la respuesta que genere la planta y va a depender de la intensidad del estrés, el tiempo de exposición, la especie, la edad y el genotipo. Para ello, la aclimatación al frío tiene lugar luego de que las plantas se exponen a

temperaturas no letales (sin congelación), lo que implica la activación de diversos mecanismos que contribuyen colectivamente a mejorar la tolerancia al frío (Keller *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2011; Pareek *et al.*, 2017).

Las plantas al ser organismos sésiles se exponen constantemente a estrés abiótico, donde las temperaturas invernales son críticas para el crecimiento, pero más aún en los episodios de heladas primaverales, debido a que muchas plantas no están aclimatadas para tolerar esas condiciones, lo cual genera las mayores tasas de daño y muertes de los individuos. A su vez, el estrés por frío se puede diferenciar en dos tipos, el estrés por bajas temperaturas que ocurre por debajo de los niveles óptimos del metabolismo (bajo los 20 °C), que ocasiona modificaciones en la síntesis y estructura de proteínas, cambios en la estructura de las membranas, disminución en la tasa fotosintética y respiratoria y por lo tanto, influye negativamente en el crecimiento y desarrollo del individuo (Taiz and Zeiger, 2006). Por otra parte, el estrés por congelación se refiere a las temperaturas inferiores a 0° C que pueden ocasionar daños más severos e irreversibles llegando incluso a producir la muerte del tejido y/o del individuo (Chinnusamy *et al.*, 2007, Pareek *et al.*, 2017). Esto se debe principalmente por el daño ocasionado por cristales de hielo que se forman en el espacio apoplástico, rompiendo la membrana plasmática, organelos u otras endomembranas (Pearce and Ashworth, 1992; Taiz and Zeiger, 2006; Beck *et al.* 2007, Warren, 1998), lo que conduce a un estado de deshidratación celular que provoca que el organismo entre en un estrés hídrico y que por lo tanto, desencadena respuestas propias de este (Chaves *et al.*, 2003). Además afecta la absorción

de nutrientes, la conformación de las proteínas, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), influye en el metabolismo celular, entre otros (Chinnusamy *et al.*, 2007).

El proceso de aclimatación ocurre cuando la planta percibe el estímulo del frío al detectar los cambios en la membrana citoplasmática a través de sensores de señal del frío (por ejemplo COLD1). Luego la transducción de señales de frío, implica la activación de canales y/o bombas de Ca^{2+} , el cual es el principal mensajero secundario que ingresa a las células, provocando la unión a diversas proteínas, como calmodulina (CaM), CBL (calcineurin B-like proteins), quinasas, entre otras. Un ejemplo son las quinasas dependientes de calcio (CDPK) que se fosforilan al momento de entrar en contacto con concentraciones de calcio que están presentes en estrés abiótico, incluido el frío (Yuan *et al.*, 2018). Estas CDPK activan varias proteínas reguladoras, incluyendo factores de transcripción, acumulación de metabolitos relacionados a estrés, cambios en flujos de iones a través de membranas y procesos que influyen en el desarrollo del individuo. Por lo tanto, las cascadas de señalización provenientes de la activación por Ca^{2+} para diversas proteínas, finalmente generan cambios en la regulación de la expresión génica de chaperonas, proteínas anticongelantes, proteínas transportadoras, fitohormonas, entre otros (Yadav, 2010). Adicionalmente se ha observado que la cutícula cumple un rol importante, debido a que se ha evidenciado que diversos genes asociados a esta compleja estructura responde bajo esta condición de frío (Borisjuk *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011) incluyendo en el género *Eucalyptus* (Keller *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no está clara la función específica que podría

cumplir y los genes asociados a la ruta de síntesis en condiciones de estrés por frío. Por ello, varios estudios han demostrado que proteínas, enzimas, factores de transcripción, entre otros que participan en la ruta metabólica de la síntesis de cutícula juegan un rol importante en la modificación química de ésta en respuesta a tratamientos al frío. Algunos ejemplos publicados por Yangyang *et al.*, (2016) dan cuenta sobre factores de transcripción SHN1 y SHN9 que regulan la expresión de varios genes de síntesis de cutina y cera cuticular. También el trabajo realizado por Amid *et al.*, (2012) donde una mutación knockout en Acetil-CoA carboxilasa homomérica produce diferencias de cutícula inducidas por frío, generando cambios en la acumulación de componentes cuticulares.

En especies de interés comercial también se han realizado estudios sobre la composición cuticular, en particular en especies de *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido a través espectroscopia infrarroja (FT-IR) con la finalidad de determinar la composición química de la cutícula en condiciones control y tratamiento al frío (Arias, 2016), donde se pudo concluir que existe un cambio en la composición química de la cutícula de lámina foliar de *eucalipto*, cuando las plantas son comparadas entre la condición control (NA) y aclimatado después de helada (ADH). Las hojas de *E. nitens* e híbrido tolerante, presentaron cambios diferenciados en el contenido de cadenas alifáticas en respuesta a la aclimatación a la baja temperatura, comparado con *E. globulus* e híbrido sensible, que presentaron en su mayoría proteínas y carbohidratos (tabla 1).

Tabla 1. Composición química de cutícula por FT-IR entre especies de *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido en condición control (NA) y aclimatado después de helada (ADH). Genotipo G1 (*E. globulus*), G2 (*E. nitens*), G4 (híbrido sensible *E. nitens* x *E. globulus*), G6 (híbrido tolerante *E. nitens* x *E. globulus*). Extraído de Arias (2016).

	NA			ADH		
G1 <i>E. globulus</i>	1032	v(CO) v(CC) v(CCO)	Polisacáridos	--		
G2 <i>E. nitens</i>	1032	v(CO) v(CC) v(CCO)	Polisacáridos	2912	$v_{\alpha}(\text{CH}_2)$	Cadenas
				2848	$v_s(\text{CH}_2)$	Alifáticas
				1732	$v(\text{C}=\text{O})$	Esteres
				~3400	OH	Polisacáridos
G4 híbrido	--	--	--	1736	$v(\text{C}=\text{O})$	Esteres
				1688	Amida I	Proteínas
				1172	$v(\text{COC})$	Esteres
				2916	$v_{\alpha}(\text{CH}_2)$	Cadenas Alifáticas
G6 híbrido tolerante	--	--	--	$v_{\alpha}(\text{CH}_2)$		Cadenas
				$v_s(\text{CH}_2)$		Alifáticas

-- No se encontraron bandas diferenciales

Por lo tanto, a raíz de los trabajos publicados sobre los cambios que existen al modificar la expresión de factores de transcripción, enzimas, transportadores, entre otros, que participan en la ruta metabólica de síntesis cuticular y respaldado por el trabajo realizado por Arias (2016) en respuesta a tratamientos al frío en *Eucalyptus spp* sobre composición

química de la cutícula a través de FT-IR, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen variaciones en la abundancia de transcritos asociados al proceso de síntesis cuticular en tratamientos de congelación entre especies de *Eucalyptus spp* que podrían modificar cambios en la composición química de la cutícula?

Biosíntesis de la cutícula

La cutícula de las plantas es un poliéster hidrofóbico que se sitúa principalmente hacia la pared externa de las células epidérmicas con una distribución heterogénea a lo largo de toda la planta. (Buda *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2014; Heredia-Guerrero *et al.*, 2014). Dentro de la cual, tiene varias funciones críticas, que incluyen en la regulación de la cantidad de agua, evitar la infección de patógenos, diferenciación de órganos, protección UV, estrés por frío, entre otros (Borisjuk *et al.*, 2014; Bourgault *et al.*, 2020; Guzmán *et al.*, 2014; He *et al.*, 2018; Heredia-Guerrero *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019).

La cutícula está compuesta principalmente por cutina y por ceras cuticulares. Por una parte, la cutina es un biopolímero de ácidos grasos hidroxilados de C₁₆ o C₁₈ insoluble y moléculas de glicerol entrecruzados por enlaces covalente (Borisjuk *et al.*, 2014; Heredia-Guerrero *et al.*, 2014). La segunda fracción, corresponde a ceras cuticulares que están compuestas de ácidos grasos saturados de cadena muy larga (VLCFA) de C₂₀ a C₃₄ incluidos alcoholes, aldehídos, alcanos, ésteres, cetonas (Bourdenx *et al.*, 2011; Guzmán *et al.*, 2014; He *et al.*, 2018, Trivedi *et al.*, 2019) y en

algunas especies, varios metabolitos secundarios lipófilos, como triterpenoides, flavonoides y tocoferoles (Yeats *et al.*, 2013).

La cutina y ceras cuticulares utilizan ácidos grasos de C₁₆ y C₁₈ producidos por síntesis de novo en plástidos utilizando acil-coenzima A (CoA) como precursor para la síntesis de monómeros de cutina y componentes de la cera llevados a cabo en el retículo endoplasmático (RE). En *Arabidopsis thaliana* la síntesis de cutina proviene de ácidos grasos de C₁₆ y C₁₈ se activan en forma de acil-CoA por dos acil-CoA aciltransferasas de cadena larga presentes en RE, LACS1 y LACS2 (Fig. 1). Luego la oxidación de las cadenas de acilo son catalizadas por varias enzimas del citocromo P450 (subfamilia CYP en *Arabidopsis*). Además se ha establecido que la construcción básica del polímero de cutina es a través de 2MAG sn-2 mono(oxigenado) acil-glicerol, llevado a cabo con ayuda de la enzima GPAT (glycerol-3-phosphate: acyl-CoA acyltransferases) (Borisjuk *et al.*, 2014; Joubès and Domergue, 2018; Suh *et al.*, 2005). En cuanto a la polimerización de cutina se ha demostrado que tiene lugar dentro de la pared celular, donde la enzima cutina sintasa es la encargada de generar oligómeros lineales y añadir moléculas de glicerol entrecruzados por enlaces covalentes (Fig. 1), no obstante se sugiere que existen otras enzimas responsables de la ramificación (Joubès and Domergue, 2018).

La síntesis de cera cuticular se encuentra mucho más documentada, la cual comienza cuando los precursores aumentan su cadena principal entre C₂₀ - C₃₄ (VLCFA) en el RE por el complejo de elongación de ácidos grasos

(FAE), donde participan cuatro principales enzimas CER10, KCR, PAS2 y ECR, que generan la elongación C₂₀ a C₃₄ (figura 1), en conjunto con la enzima β-cetoacil-CoA sintasa (KCS) como enzimas limitante de la velocidad del complejo. Además proteínas como CER2, WSD1, FAR3 también forman parte de la elongación y síntesis de ceras, alcoholes, aldehídos, entre otros (Bourdenx *et al.*, 2011; He *et al.*, 2018; Joubès and Domergue, 2018; Zhang *et al.*, 2019). Posteriormente los VLCFA resultantes, pueden entrar a cualquiera de las dos vías localizadas en el RE: una vía de reducción de acilo, responsable de la producción de alcoholes primarios y ésteres de cera o una vía de formación/descarbonilación de alcanos, que produce alcanos, aldehído, cetonas y alcoholes secundarios (Joubès and Domergue, 2018; Trivedi *et al.*, 2019). Luego de la síntesis, los lípidos cuticulares proceden a transportarse desde el RE a la membrana plasmática a través de tres rutas posibles: transporte vesicular, tráfico a través de proteínas transportadoras (familia ABCG principalmente) y transferencia directa a través de uniones de membrana. Adicionalmente se ha sugerido que las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) están involucradas en el transporte de lípidos cuticulares desde la membrana plasmática a través de la pared celular (Singh *et al.*, 2018).

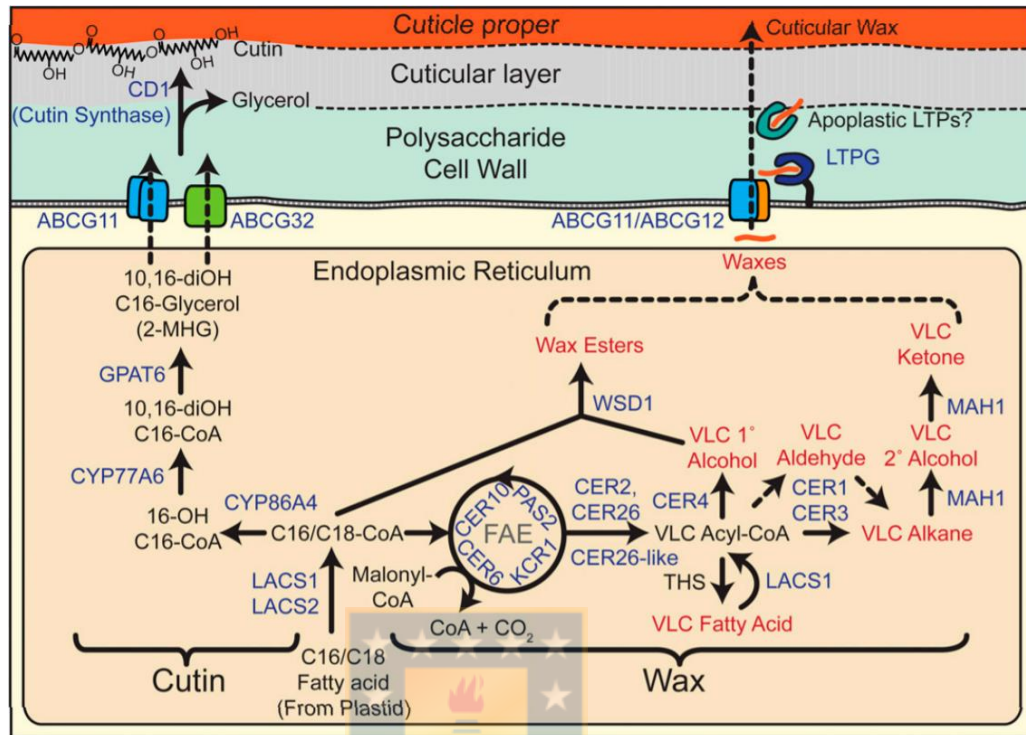


Figura 1: Biosíntesis de cutina y ceras cuticulares presentes en células epidérmicas. En su conjunto inician desde la producción de ácidos grasos C16/C18 que posteriormente ingresan a diferentes rutas para generar cetonas, alcoholes secundarios, aldehídos, alcoholes primarios, ésteres y cutina, exportados al medio extracelular por proteínas transportadoras. Extraído de (Yeats *et al.*, 2013). Por lo tanto, el proceso metabólico de la síntesis cuticular involucra una gran cantidad de genes que pueden influir tanto en la composición cuticular como en la regulación de la síntesis de la cutícula, lo que permite enfrentar ambientes adversos y/o bióticos, regulados por factores de transcripción, transportadores y enzimas. Es así, como se ha propuesto que existen más de 190 genes asociados a la ruta metabólica de la síntesis de cutícula (Borisjuk *et al.*, 2014).

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

A raíz del conocimiento del cambio de la composición química de la cutícula en *Eucalyptus sp.* basado en análisis FT-IR (Arias 2016), el presente trabajo de investigación propone estudiar la expresión de genes implicados en la regulación cuticular, analizando los cambios a nivel transcriptómico global bajo estrés por baja temperatura, utilizando métodos computacionales para el análisis *de novo* de datos RNA-seq de genotipos sensibles a bajas temperatura (*E. globulus*) y tolerantes (*E. nitens* e híbrido *E. nitens x E. globulus*). Por lo tanto, en base a esto se propone la siguiente hipótesis de trabajo:



2.1 Hipótesis

Existen diferencias significativas en la abundancia de transcritos implicados en la síntesis de cutícula en respuesta a tratamientos de congelación entre individuo sensible (*E. globulus*) y tolerantes (*E. nitens* e híbrido *E. nitens x E. globulus*).

2.2 Objetivo general

Comparar el perfil transcripcional de tejido foliar relacionado a biosíntesis de cutícula en *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido en respuesta a estrés por congelación.

2.3 Objetivos específicos:

1. Elaborar perfiles transcriptómicos a partir de datos RNA-Seq de *Eucalyptus spp.*

2. Evaluar la expresión *in silico* de los genes que participan en la síntesis de cutícula y comparar entre *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido en tratamientos de aclimatación a temperaturas congelantes.

3. Generar una red de regulación génica de síntesis cuticular en *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido.

4- Validar mediante qPCR la expresión de al menos 8 genes que presenten diferencias significativas entre plantas de *Eucalyptus spp* en respuesta a tratamientos de congelación.

III. METODOLOGIA

3.1 Material vegetal y datos RNAseq.

Los datos con que se inicia este trabajo, se obtuvieron en el laboratorio de Genómica Forestal del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, donde se realizó un ensayo bajo condiciones de estrés al someter a plantas a bajas temperaturas reportado por Solís *et al.*, (2019) simulado a través de las variaciones del tiempo en el cual las plantas se exponen en el terreno (figura 2), para las especies de *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido. Para validación mediante qRT-PCR se utilizaron muestras de *E. nitens* correspondientes a una familia de medios hermanos (Gaete-Loyola *et al.*, 2017), para *E. globulus* (Fernández *et al.*, 2012) y *E. nitens x E. globulus* (FONDECYT 11121559) se utilizó un genotipo de cada especie.

Se colectaron plantas en condición aclimatado después de helada (ADH), aclimatado antes de la helada (AAH) y no aclimatado (NA). Las plantas se sometieron a un tratamiento de aclimatación a baja temperatura, la primera parte del perfil de aclimatación, correspondió a la condición de NA, que consistió en una duración de 14 horas al día con una temperatura de 20 °C día/12 °C noche durante 10 días, siendo el primer punto de muestro al termino del día 10 correspondientes a 3 plantas por especie. Posteriormente para la tolerancia al congelamiento, las plantas fueron expuestas a fotoperiodos más cortos y temperaturas más bajas, (simulando lo que ocurre en otoño) esta etapa corresponde a aclimatación antes de helada (AAH), realizado por un periodo de 7 días a 8 °C día/4 °C noche, siendo el segundo

punto de muestro al termino del día 17 correspondientes a 3 plantas por especie. Luego para conseguir la aclimatación a temperatura congelante, las plantas se expusieron a heladas nocturnas (simulación invierno), tratamiento denominado ADH consistente en 4 días, a 8 °C día/4 °C noche, en cada día se simularon heladas nocturnas hasta -2 °C y luego se retornó a temperatura 8 °C día/4 °C noche. Al día siguiente de la última helada se realizó el último punto de muestreo a 3 plantas por especie. Todo el material vegetal fue entregado por Forestal Mininco S.A., las que corresponden a rametos enraizados de 6 meses de edad, un largo aproximado de 35 cm con al menos 8 hojas expandidas, las que posteriormente se llevaron a cámaras de crecimiento con control de temperatura y fotoperiodo (Fernandez *et al.* 2015). Además se realizaron mediciones de LT50 para el aseguramiento de las condiciones de aclimatación y un ensayo de supervivencia de las plantas en el ensayo (Anexo 1 y 2).

Las extracciones de ARN y síntesis de cDNA se realizaron según el protocolo indicado en Gaete-Loyola et al., (2017). Posterior al ensayo de aclimatación a bajas temperaturas, se realizó la secuenciación masiva para *E. globulus* e híbrido con Illumina y para *E. nitens* con Ion Torrent, obteniendo millones de lecturas single-end con 3 réplicas biológicas para cada condición (NA, CAAF, CABF) y para cada especie en estudio.

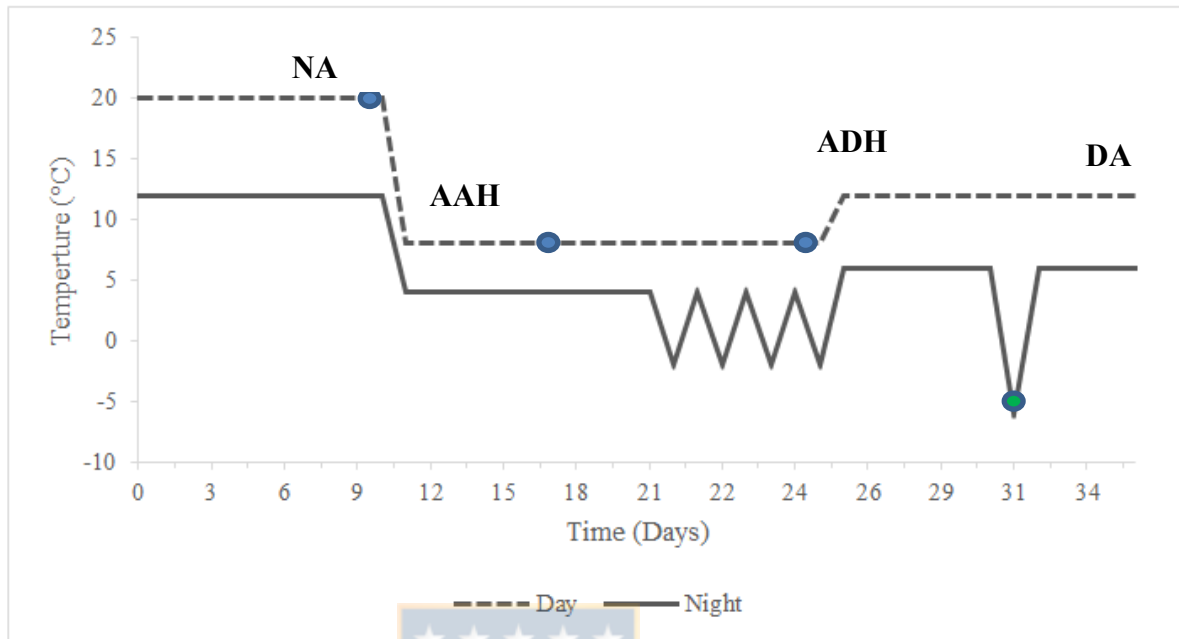


Figura 2: Perfil de aclimatación utilizado en ensayo de estrés por bajas temperaturas. NA (no aclimatado), AAH (aclimatado antes de helada) y ADH (aclimatado después de helada). DA (Desaclimatado) no se consideró para este proyecto. Las temperaturas -6,-8 y -10°C fueron aplicadas al final del tratamiento, correspondientes a ensayos de daño y supervivencia (anexo 1 y 2) (Modificado de Fernández *et al.*, 2010).

3.2 Control de calidad, ensamble *de novo* y anotación de transcriptomas

Los datos RNA-seq de las muestras secuenciadas se pre-procesaron, donde se evaluó la calidad de las lecturas a través de FastQC versión 0.11.8 (disponible en <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) y se hizo el trimming con Cutadapt versión 2.3 (Martin, 2011), para eliminar restos de partidores y reads de baja calidad ($Q < 30$). Luego se realizó el

ensamble de *novo* de *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido con Trinity-v2.6.6 donde se varió la longitud k-mer 25 y k-mer 32. Luego se aplicó una disminución de los contigs ensamblados por similitud de un 98% con CD-HIT-EST versión 4.8.1 (disponible en <http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>) para las especies de *E. globulus* e híbrido. Finalmente para determinar los mejores ensambles, se consideraron parámetros de longitud media de contigs, número de contigs, número total de bases ensambladas y N50 de los ensambles.

Para la anotación de los transcriptomas, primero se llevó a cabo un mapping con GMAP (Wu & Watanable, 2005) entre el transcriptoma ensamblado y el genoma de *E. grandis* como referencia v2.0 (JGI Phytozome website <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), donde posteriormente se descargó desde la base de datos de Phytozome el archivo genoma exones de *E. grandis* gff3 que contiene el formato de coordenadas de los genes para posteriormente enlazarlos con featureCounts 1.6.4. (Liao *et al.*, 2014) que entrega las ubicaciones cromosómicas de los genes para poder realizar la anotación guiado por genoma de *E. grandis*, todo esto se llevó a cabo para las tres plantas en estudio.

3.3 Análisis de expresión diferencial.

Luego de obtener los ensamblados se procedió a mapear las bibliotecas procesadas de las 3 condiciones de *E. globulus*, *E. nitens* híbrido y (AAH, ADH y NA). Se utilizó como referencia el transcriptoma ensamblado para las tres especies en estudio, para mapear con Bowtie2 versión 2.3.4.3 (Anexo 3) (Langmead and Salzberg, 2012) con el parámetro *very sensitive* y método *single-end* para cada biblioteca, con una salida en formato SAM, para luego hacer el procesamiento de transformar a binario (BAM), remover las lecturas que no mapearon y generar la tabla de conteo a través de Samtools 1.9.

Para estimar la expresión génica, primero se utilizó el archivo de conteos proveniente de featureCounts, el cual contiene la anotación guiado por mapeo con *E. nitens*. Luego de esto, se sumaron los valores de conteo de reads, correspondientes a los *contig* anotados para un mismo gen de referencia. Posteriormente, en el análisis de expresión diferencial se ejecutaron dos software para *E. globulus*, *E. nitens* e híbrido siendo edgeR (Robinson *et al.*, 2010) y DESeq2 (Love *et al.*, 2014), ambos utilizados de bioconductor/R Project (<https://www.r-project.org/>) para las tres condiciones, donde se realizan las siguientes comparaciones: NA-AAH, NA-ADH, y AAH-ADH. En las 3 comparaciones se filtraron los *count* por millón menores o igual a 5, debido a que desde un punto de vista biológico, un gen debe expresarse en un nivel mínimo antes de que sea probable su traducción a una proteína y desde un punto de vista estadístico, es muy poco

probable que los genes con recuentos bajos se evalúen como expresados diferencialmente significativos, ya que no hay evidencia estadística confiable (Yunshun *et al.*, 2016). Luego se normalizaron los datos y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para ver la distribución de las muestras y eliminar aquellas que tienen una varianza estadísticamente distinta a las de su mismo grupo. En el caso de *E. nitens* se consideró utilizar NOISeqBIO, debido a que se eliminaron algunas réplicas biológicas desde el PCA, ya que sólo teníamos 2 réplicas, por la similitud entre varianzas y las condiciones de estudio para el posterior análisis de expresión diferencial. Posterior a los análisis se obtiene el output con parámetros de filtros de p-value y FDR < 0.05, similares a los de Podpečan *et al.*, (2011) y en el trabajo realizado por Gasparini *et al.*, (2014). Finalmente se obtienen los resultados en un archivo texto ordenado por p-value.

3.4 Identificación de genes cuticulares

Se realizó una búsqueda en literatura de los genes que participan en la biosíntesis de cutícula, en conjunto con bases de datos como ruta metabólica de lípidos de *Arabidopsis thaliana* (<http://aralip.plantbiology.msu.edu>) y la base de datos KEGG en el metabolismo de lípidos específico para biosíntesis de cutina y ceras cuticulares (<https://www.kegg.jp>). A raíz de esto, se obtuvieron todos los genes involucrados en la síntesis de cutícula principalmente proveniente de *A.thaliana*. Además se realizó una búsqueda de todos los genes presente en

la red reguladora AtRegNet presente en Agris (<https://agris-knowledgebase.org>) con la finalidad de obtener todas las interacciones presentes en *A.thaliana* asociados a la síntesis de cutícula.

3.5 Gene Ontology

Para el análisis de ontología génica (GO) se utilizó el paquete de R clusterprofile (Yu G *et al.*, 2012), donde se realizó el análisis de sobrerrepresentación de los GO en proceso biológico (BP). Para ello, se ingresaron 188 genes de la ruta de síntesis cuticular. Para la visualización se utilizó un gráfico de puntos donde muestra el número de genes asociados a la característica GO a través del tamaño de cada punto. Esto asociado al valor GeneRatio que entrega el recuento de genes asociados a una característica GO comparada con la lista completa de genes (*background*).

3.6 Evaluar interacción proteína - proteína

Desde los genes que participan en la síntesis de cutícula y que se encuentran diferencialmente expresados en las tres especies, se ingresaron a STRING para evaluar la interacción con otras proteínas que puedan regular esta ruta metabólica. Además, se seleccionaron las proteínas que tuvieron una estrecha relación entre ellas (principalmente por co-expresión y datos experimentales) y se realizó la búsqueda en el perfil transcriptómico para determinar si estas proteínas cambian sus niveles de expresión en los distintos tratamientos y de esta manera relacionarlo con los genes que participan en la síntesis de cutícula en tejido foliar de especies en estudio.

3.7 Identificación de factores de transcripción

Se utilizó la base de datos de Agris proveniente de *A.thaliana*, en la cual se encuentran todos los factores de transcripción (FT) reportados para esta especie, donde se combinó esta base de datos y los resultados obtenidos de los genes que participan en la síntesis de cutícula expresados diferencialmente. Posteriormente, se seleccionaron todos los *match* de FT para los genes en estudio y se realizó la búsqueda en el perfil transcriptómico, para evaluar si estos FT presentan cambios en sus niveles de expresión en los diferentes tratamientos.

3.8 Selección de genes cuticulares

Posterior al análisis de expresión digital en las diferentes condiciones en *Eucalyptus spp*, se procedió a seleccionar los genes para validación mediante qPCR, para ello se debió cumplir con el siguiente criterio. Los genes provenientes del análisis de expresión diferencial deben ser contrastantes en sus niveles de expresión en la especie *E. nitens* y *E. globulus*, debido a que se espera que tengan una respuesta diferente en condiciones de frío. Para ello, se realizó un *heatmap* para visualizar los niveles de expresión de los genes de síntesis de cutícula en las especies en estudio (Anexo 9). Posteriormente, se seleccionaron 6 genes provenientes de la síntesis de cutícula, un gen proveniente de interacción proteína-proteína y un factor de transcripción que participa en la red de regulación de cutícula. Finalmente se corroboraron los dominios funcionales con sus homólogos anotados en *A. thaliana*, en la cual se tomaron los *contigs* reportados para cada proteína en cada genotipo, alineando y generando el ensamble con Geneious. Posteriormente se ensamblaron *contigs* asociados a genes candidatos y se utilizó HMMscan para la predicción de dominios funcionales de las proteínas en estudio, con base de datos Pfam 35.0 (Anexo 4 y 5).

3.9 Validación de genes diferencialmente expresados por qPCR.

Se realizó qPCR para validar la expresión de genes cuticulares, que corresponden a ocho genes, de los cuales dos provienen de interacción proteína-proteína y dos factores de transcripción. Los genes se seleccionaron según su nivel de expresión y diferenciación entre los genotipos. 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 se diseñaron mediante Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012) y se evaluó eficiencia considerando un rango entre 90% y 110%. Cada reacción de qPCR contenía 3 μ L de ADNc, 4 μ L de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 0,6 μ M de cada partidador específico, obteniendo un volumen final de 20 μ L. 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 α y UBC9 para *E. globulus* junto con GADPH y EiF4a para *E. nitens* e híbrido según lo descrito por (Fernandez *et al.*, 2012) para la condición de estrés por frío. Posteriormente se realizó el análisis de expresión relativa a través del método delta-delta-CT. Se realizó un test de análisis de varianza ANOVA de dos vías con intervalo de confianza de 95% ($p < 0,05$) y un test a posteriori de Tukey (least significant difference) para identificar diferencias significativas entre la expresión de los genes cuticulares en las condiciones evaluadas y se usó como muestra calibradora el rameto que tuvo el menor nivel de expresión por cada genotipo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Pre-procesamiento, ensamble y anotación de transcriptomas

Nueve librerías de hoja de *E. globulus* y híbrido se secuenciaron en la plataforma Illumina *single end* y para el caso de *E. nitens* a través de la tecnología Ion-Torrent. Estas librerías corresponden a condiciones de aclimatado antes de helada (AAH), aclimatado después de helada (ADH) y no aclimatado (NA) como control.

Posterior al ensamble de los transcriptomas se pueden obtener diferentes métricas que permiten determinar la calidad de los ensambles, dentro de los cuales se consideró la cantidad de *contig* y el N50 que son alguno de los más relevantes (O'neil & Emrich, 2013). Además se observa en la tabla 2 que en el caso de *E. globulus* el ensamble con *kmers* 32 fue el que obtuvo mejores resultados al igual que en híbrido, ya que tuvieron mejores valores en sus métricas comparándolos con el *kmers* 25. Además otra métrica relevante al momento de seleccionar los mejores ensambles fue la anotación que se obtuvo con *E.grandis* v2.0 utilizando como base de datos Phytozome. De esta manera, se puede tener una estimación de los genes anotados en cada genotipo, teniendo como base los 36.349 genes que presenta *E.grandis*.

Para el caso de *E. nitens*, se utilizó el transcriptoma reensamblado por Solís *et al.*, (2019), ya que se obtuvo un mejor resultado comparándolo con el *kmers* 25 y 32 (tabla 2).

Tabla 2: Resumen del ensamble de transcriptomas para *E. globulus*, híbrido y *E. nitens*. Métricas paramétricas de ensambles con Trinity, utilizando kmers 25 y kmers 32 en los tres genotipos.

Métricas	híbrido K25	híbrido K32	<i>E. globulus</i> K25	<i>E. globulus</i> K32	<i>E. nitens</i> K32	<i>E. nitens</i> (Solis <i>et al.</i> , 2019)
Contigs	283.673	148.429	192.990	244.011	56.030	1.460.729
Bases ensambladas	323.122.783	253.466.775	173.319.796	225.320.547	22.800.448	393.636.148
N50	2.462	2.570	1.559	1.571	425	296
Contig promedio (bp)	1.165	1.254	416	499	215	244
Anotación Phytozome	19.845	22.725	21.539	25.969	-	34.213

Para el análisis de expresión diferencial se realizó inicialmente un mapping con bowtie2 entre las librerías de cada genotipo con los respectivos transcriptomas, los cuales corresponden a un promedio de 96,5% para *E. globulus*, un 89,7% para híbrido y un 51,2% para *E. nitens* (anexo 3). Siendo este último el que obtuvo un menor porcentaje de mapeo. Esto podría deberse principalmente a la tecnología de secuenciación Ion-torrent con la cual se obtuvo este transcriptoma, ya que genera millones de lecturas demasiado cortas e irregulares de alta calidad (<100 pb), además de errores asociados con homopolímeros (regiones de ADN con 6 o más nucleótidos idénticos consecutivos) (Loman *et al.*, 2012; Rodríguez-Santiago & Armengol 2012). Por ende, se refleja principalmente en la baja calidad de las lecturas y en consecuencia en un ensamble de baja calidad. No así en el caso de los otros dos genotipos que se secuenciaron con tecnología Illumina,

lo cual aporta una mayor precisión y menor tasa de error en su secuenciación.

Paralelamente, la anotación guiado por mapeo utilizando GMAP para los tres transcriptomas y *E. grandis* mostraron que en *E. globulus* se anotaron 20.477 (99,08%), en híbrido 20.483 (99,9%) y *E. nitens* 23.680 unigenes (98,61%) (Fig. 4a). Por lo tanto, se comprende que existe una amplia cobertura entre los transcriptomas ensamblados y el genoma referencia de *E. nitens* y en consecuencia, se pudieron anotar la gran mayoría de los *contigs* ensamblados.

4.2 Expresión diferencial de transcriptomas *Eucalyptus spp.*

Para todos los análisis de expresión diferencial se realizaron de manera preliminar filtros de conteos por millón menores o igual a 5, luego se normalizaron y se observaron mediante PCA las distribuciones de las muestras de cada librería en sus respectivas dimensiones. En el caso de *E. nitens* éste presentó en una de sus réplicas (NA1) una asociación similar a la del grupo CAAF (Fig. 3a), por lo tanto, esto demostró que esta librería no poseía atribuciones para diferenciarlas (similitud de varianzas en la primera dimensión del PCA) con respecto a la otra condición ambiental (CAAF). Es por ello, que la réplica NA1 fue excluida de *E. nitens*, donde finalmente sólo se trabajó con 2 réplicas NA2 y NA3 (Fig 3b). Además un caso similar ocurrió en el PCA de CAAF y CABF (Fig. 3c), donde en una de sus réplicas de esta última condición no pudo diferenciarse de CAAF, esto

debido a las similitudes de las varianzas y por lo tanto, no demostró diferencias entre estas dos condiciones. De este modo, al igual que en el caso anterior se eliminó la réplica CABF1 (Fig.3d). Por lo tanto, al tener un nuevo escenario de datos transcriptómicos para análisis de expresión, se optó por utilizar NOISeqBIO permitiendo así trabajar de mejor manera cuando se tienen pocas réplicas para el análisis de expresión.

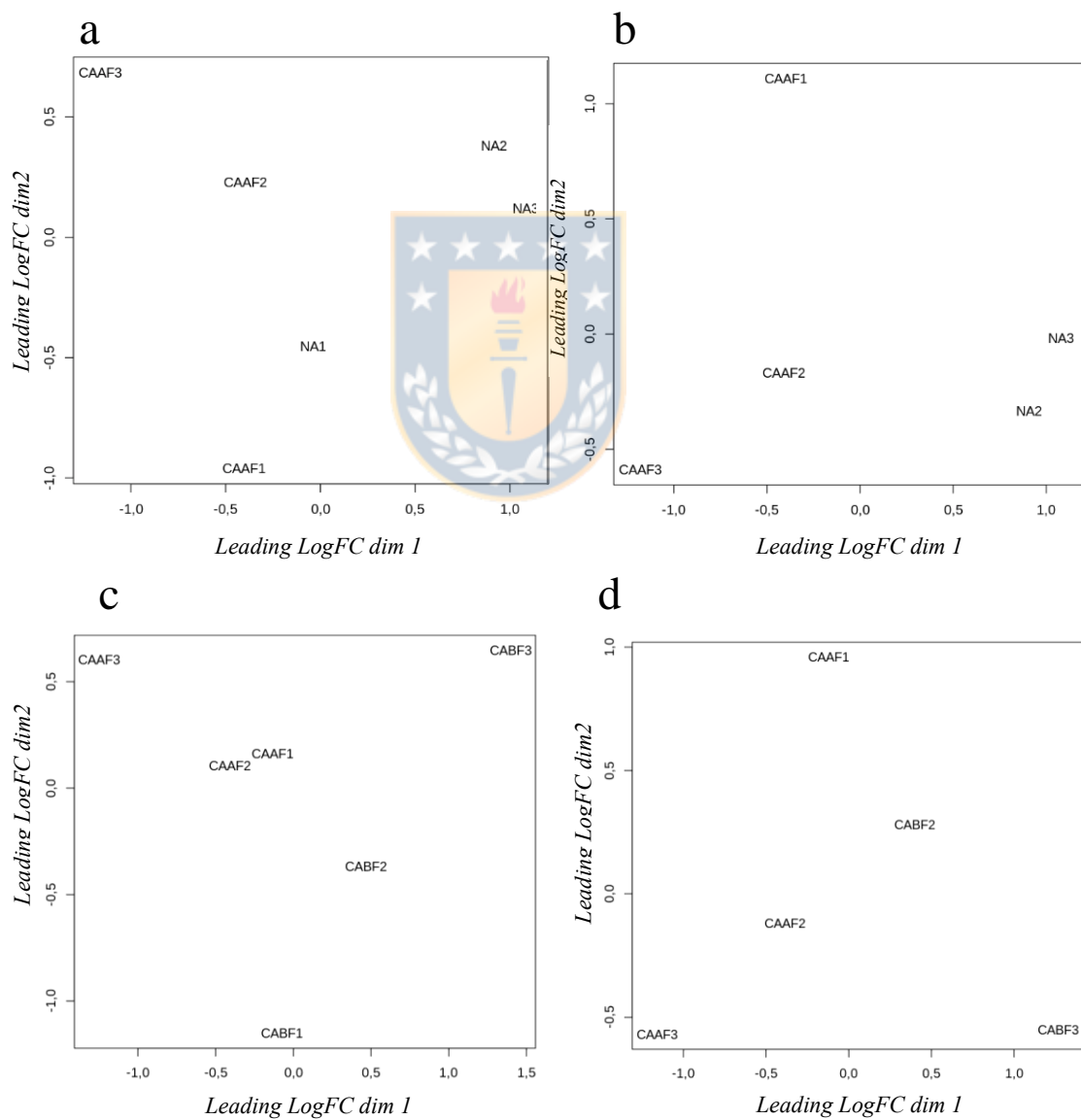


Figura 3: Análisis de componentes principales (PCA) de librerías *E. nitens* los cuales representan la eliminación de réplicas en 3,B y 3,D para la condición NA y CABF respectivamente.

Preliminarmente se obtuvieron todos los genes expresados diferencialmente del perfil transcriptómico de los genotipos en estudio. Se observa que en la tabla 3 existen diferencias en la cantidad de genes expresados diferencialmente tanto por condición como por genotipo para las distintas herramientas utilizadas en los análisis (Deseq2, edgeR y NOISeqBIO). Sin embargo, los análisis de correlación de Spearman demuestran que existen pequeñas diferencias en las comparaciones de logFC entre los genes utilizando los distintos tipos de software. Por ejemplo, en el caso del genotipo híbrido la correlación es de un 92% entre todas las condiciones usando DEseq2 y edgeR, al igual que en *E. globulus* donde existe un 85% entre todas las condiciones y para *E. nitens* se obtuvo un 97% de correlación entre los logFC de DEseq2, EdgeR y NOISeqBIO. Este último valor más alto se debe principalmente al menor número de genes expresados diferencialmente al momento de la comparación.

Tabla 3: Análisis comparativo de expresión diferencial entre EdgeR, DESeq2 y NOISeqBIO en los 3 genotipos en estudio.

		Híbido			<i>E. globulus</i>			<i>E. nitens</i>		
		Genes anotados: 20.483			Genes anotados: 20.477			Genes anotados: 23.680		
		DE	Sobreexp.	Infraexp.	DE	Sobreexp.	Infraexp.	DE	Sobreexp.	Infraexp.
EdgeR	NA-CAAF	6.275	2.905	3.370	5.666	2.810	2.856	205	110	95
	NA-CABF	4.495	2.259	2.236	4.912	2.575	2.337	223	134	89
	CABF-CAAF	1.220	463	757	4.062	2.271	1.791	126	73	53
DESeq2	NA-CAAF	10.408	5.091	5.317	7.981	3.842	4.139	111	49	62
	NA-CABF	7.650	3.592	4.058	6.354	2.957	3.397	84	49	35
	CABF-CAAF	3.011	1.487	1.524	5.911	3.131	2.780	59	31	28
NOISeqBIO	NA-CAAF	-	-	-	-	-	-	1708	738	970
	NA-CABF	-	-	-	-	-	-	2401	1235	1166
	CABF-CAAF	-	-	-	-	-	-	886	278	608

DE: Diferencialmente expresados



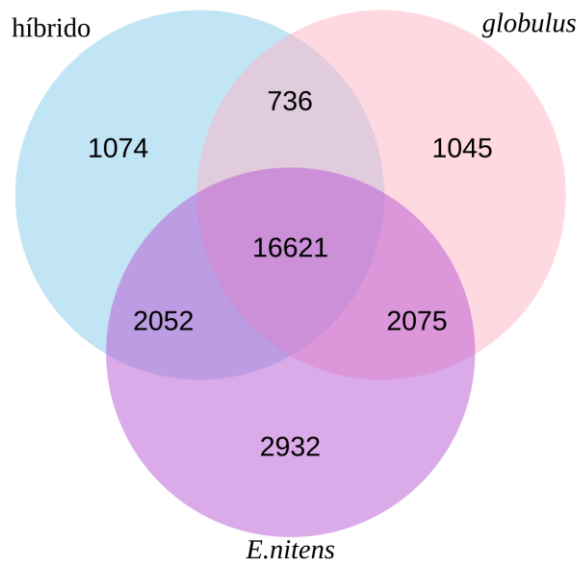
4.3 Identificación de genes cuticulares

Luego de obtener los genes expresados diferencialmente por los distintos programas en los 3 genotipos en estudio, se realizaron los análisis de la ruta metabólica de síntesis cuticular. Para ello, se tomaron estos genes reportados en literatura, algunos de ellos descritos por Camoirano *et al.*, (2020); Tafolla-Arellano *et al.*, (2017); Zsolt *et al.*, (2013); Sylvain *et al.*, (2015); Ma Xiaowen *et al.*, (2015); la base de datos KEGG específicamente en la ruta de síntesis de lípidos (Kanehisa *et al.*, 2021; la base de datos plant metabolic network (Hawkins *et al.*, 2021) (PMN) y la ruta metabólica de lípidos de *A. thaliana* (Li-Beisson *et al.*, 2013). Se obtuvieron 382 unigenes con código de *A. thaliana* reportados por las bases de datos y literatura, los cuales corresponden a 470 genes con código *E. grandis*, lo que evidencia

que existe más de un gen de *Eucalyptus* para un mismo gen de *A. thaliana*. Posteriormente al llevar a cabo la anotación de los tres transcriptomas, se obtuvieron 291 unigenes para híbrido, 279 genes para *E. globulus* y 316 genes para *E. nitens* que participan en la ruta de biosíntesis de cutícula.

Al momento de realizar el análisis de expresión y comparar esta lista de genes cuticulares, se obtuvieron 160, 215 y 70 unigenes expresados diferencialmente en híbrido, *E. globulus* y *E. nitens* respectivamente (figura 4B), relacionados con la ruta metabólica de síntesis cuticular en tejido foliar. Finalmente se tomaron como referencia los resultados obtenidos por (Arias 2006) donde se demostró que plantas de *Eucalyptus spp.* expuestas a tratamiento de aclimatación después de helada (ADH) sufrieron cambios en la composición química de la cutícula por medio de la herramienta FT-IR en especies de *E. nitens* e híbrido. No así en *E. globulus* donde no se mostraron cambios significativos. Por lo tanto, a raíz de esto suponemos que al haber un cambio en la composición de cutícula podría también haber un cambio en la concentración de transcritos de proteínas reflejados en los distintos perfiles de expresión para los 3 genotipos en estudio. De esta manera, nos enfocamos en la condición ADH para dar mayor énfasis a proteínas que se expresan en el genotipo híbrido y *E. nitens* diferentes a las encontradas con *E. globulus*.

a



b

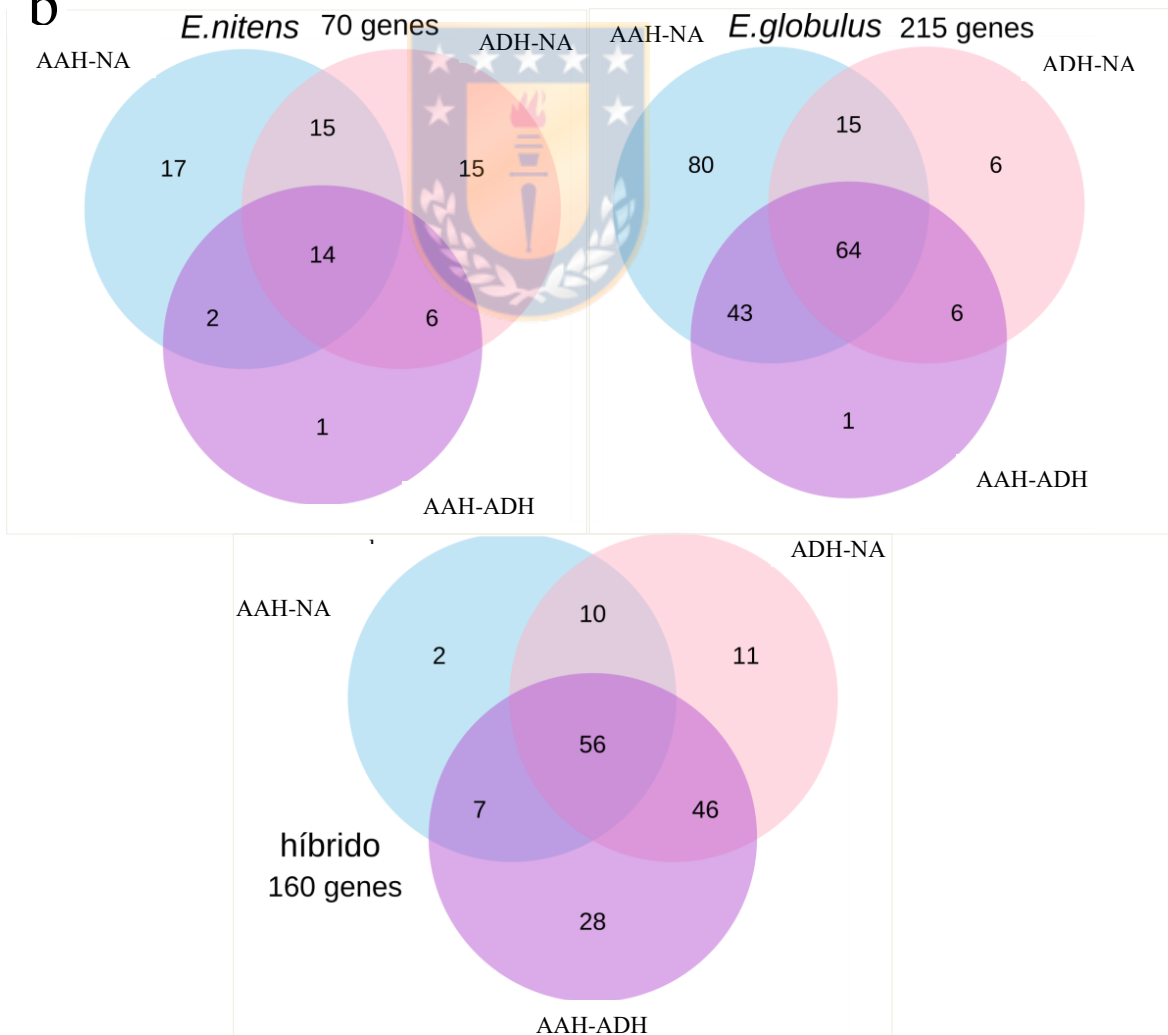


Figura 4: Diagrama de Venn entre los tres transcriptomas de *Eucalyptus spp.* a) Corresponde a la anotación guiada por mapeo contra *E. grandis*. En *E. globulus* se anotaron 20.477 (99,08%), en híbrido 20.483 (99,9%) y *E. nitens* 23.680 unigenes (98,61%). b) Diagrama de Venn de genes expresados diferencialmente en la ruta metabólica de la síntesis cuticular anotados en base a la anotación e genoma de *E. grandis* en los tres transcriptomas en estudio. Los cuales, en híbrido se obtuvieron 160, en *E. globulus* 215 y en *E. nitens* 70 genes únicos. Resultados que corresponden a los realizados por DESeq2, EdgeR y NOISeqBIO, este último para *E. nitens*.



4.4 Validación por qPCR de genes expresados diferencialmente en *Eucalyptus spp*

Con la finalidad de relacionar los análisis obtenidos por Arias en (2016) con nuestros resultados de análisis de expresión de los tres transcriptomas, optamos por enfocarnos en la condición ADH, la cual presentó mayores cambios en la composición química de la cutícula. Por lo tanto, a raíz de esto realizamos un heatmap de todos los genes expresadas diferencialmente que participan en la ruta metabólica de la cutícula (Anexo 9), donde se ingresaron un total de 188 genes únicos con variaciones entre logFC -5,6 hasta 8,6 a lo largo de los tres transcriptomas. A raíz de este resultado se facilitó la búsqueda de genes candidatos para validación por qPCR, debido a que fue posible observar genes contrastantes entre *E. globulus* versus *E. nitens* e híbrido.

Al momento de obtener los resultados de *heatmap*, elegimos un total de 8 proteínas para validación por qPCR de las cuales 6 corresponden a genes que participan directamente en la ruta metabólica de cutícula, un gen que actúa en interacción proteína-proteína con genes cuticulares y un gen asociado a factores de transcripción que participan directamente en esta síntesis cuticular.



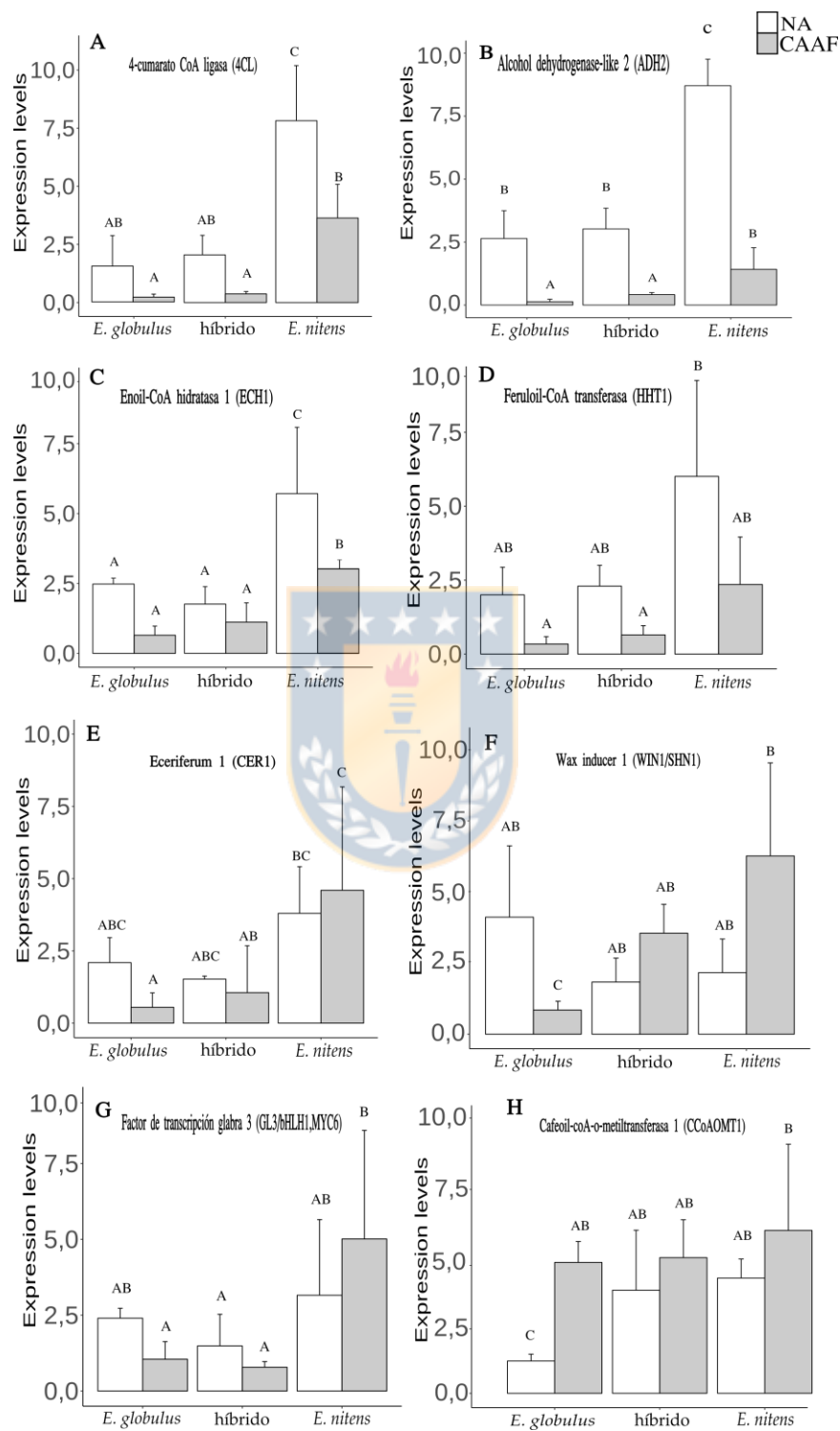


Figura 5: Acumulación de transcritos de genes de ruta de síntesis cuticular, en *E. globulus*, *E. nitens* y un híbrido (*E. nitens* x *E.globulus*). Se evaluaron dos

condiciones: control y aclimatado después de helada (NA-CAAF). (A) 4CCL9. (B) ADH2. (C) ECH1. (D) HHT1. (E) CER1. (F) WIN1/SHN1. (G) GL3/bHLH1/MYC6. (H) CCoAOMT1.

La proteína Eucgr.B00137/AT5G63380 (4CLL9) corresponde a una de las proteínas de la familia 4-cumarato CoA ligasa (4CL), la cual se caracteriza por ser una enzima clave en la regulación de la ruta de los fenilpropanoides. Sin embargo en base a estudios *in vitro* (Kienow *et al.*, 2008) y filogenético (Vries *et al.*, 2021), se ha podido determinar que 4-cumarato-CoA ligasa-like 9 (4CLL9) tiene la capacidad catalítica para activar precursores biosintéticos de la fitohormona ácido jasmónico (JA), donde se demostró que tiene una alta actividad con ácidos grasos de cadena larga y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), siendo este último con el que presenta mayor afinidad. Además se determinó que está localizada en los peroxisomas, es decir el organelo responsable de la β -oxidación de ácidos grasos y pasos principales de biosíntesis de JA (Kienow *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2005). Al igual que en el estudio publicado por Shockey & Browe (2011), en ensayos de proteínas recombinantes purificadas para 4CCL9, se demostró alta actividad con sustratos de ácidos grasos de cadena media y larga. En cuanto al funcionamiento del precursor OPDA bajo estrés por congelamiento, se ha observado que aumenta los niveles de JA, los que a su vez regulan la vía del factor de unión de repetición C (CBF). Además, se ha demostrado que los JA contrarrestan el estrés por frío al inducir enzimas que previenen las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Guan *et al.*, 2019; Sharma & Laxmi, 2016). Por lo tanto, en base a nuestros resultados tanto de qPCR (Fig.5) y de expresión diferencial mostramos que en los tres

genotipos existe una disminución entre el control y la condición ADH. Tanto en *E. globulus* como en híbrido no existen diferencias significativas por condición ni por genotipos. Sin embargo, en el caso de *E. nitens* sí existen diferencias estadísticas en los niveles de transcritos tanto por condición como la comparación entre genotipos, mostrando una diferencia que podría deberse a la tolerancia al frío que esta especie presenta. Por lo tanto, creemos que 4CCL9 podría estar cumpliendo un rol diferente a lo mostrado por literatura, ya que aún no se ha caracterizado por completo su función y no se han evaluado sus niveles de transcritos en estrés por frío. En consecuencia, en base a nuestros resultados en *E. nitens*, esta enzima podría cumplir un rol opuesto, es decir, el silenciamiento en sus niveles de expresión podría contribuir a la respuesta a estrés por frío en este genotipo. Finalmente es necesario realizar otros análisis para poder determinar la función de 4CCL9 dentro del estrés por frío, ya que como se mencionó esta proteína no se ha podido clusterizar dentro de la familia 4CL.

La proteína Eucgr.B00037/AT1G22440 corresponde a una alcohol dehydrogenase-like 2 (ADH2), la cual aún no se tiene claridad de la función que cumple en especies vegetales, debido que hasta el momento sólo se ha asociado generalmente esta familia de proteínas al estrés por déficit hídrico, donde curiosamente ADH2 no ha presentado diferencias significativas en los niveles de transcripción después del tratamiento inducido por polietilenglicol (PEG) (Myint *et al.*, 2015). Sin embargo ésta proteína presenta un 87% de conservación de sus aminoácidos con respecto a la ADH1 (Dennis *et al.*, 1985), del cual si se tiene mayor información y se ha

establecido que juega un rol importante tanto en el estrés hídrico como en frío. Se ha reportado que ADH1 está involucrada directamente en el crecimiento y respuesta a diferentes tipos de estrés en plantas, donde se evidencia que la sobreexpresión de esta proteína en *A. thaliana* mejora significativamente la respuesta a tolerancia a choques por frío (Haitao-shi *et al.*, 2017; Lijun & Xiang, 2019). Sin embargo, curiosamente nuestros resultados tanto de expresión diferencial como respaldo por qPCR en la Fig. 5, indican que esta proteína disminuye significativamente sus niveles de expresión dentro de su genotipo en la condición ADH con respecto al control. Además, se observa una disminución transversal y significativa en los 3 genotipos en estudio entre control y tratamiento, acentuándose mayormente en *E. nitens*.

Estos resultados indicarían respuestas biológicas distintas comparadas con la literatura asociada al gen en estudio, ya que existe poco conocimiento de la función específica de esta proteína. Nuestros resultados sugieren que ADH2 estaría ocupando un rol importante dentro de la célula, ya que disminuye notablemente sus niveles de expresión en condiciones de frío en los 3 genotipos, acentuándose mayormente en el genotipo tolerante al estrés por bajas temperaturas. Por lo tanto, creemos que ADH2 podría estar silenciándose a través de siRNAs (pequeños ARN de interferencia), donde puede estar regulando negativamente el gen y que probablemente sea determinante en la respuesta al estrés por frío (Chinnusamy *et al.*, 2011)

La proteína Eucgr.A00382/AT4G16210 enoil-CoA hidratasa 1 (ECH1), es una enzima que aún no se tiene con claridad su función específica dentro de

la célula, donde a través de herramientas bioinformáticas ha sido agrupado con otras proteínas peroximales de función desconocida, debido a que presenta una secuencia de orientación peroximal (PTS) (Reumann *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha documentado que podría estar implicado en el catabolismo de aminoácidos, ubicándose en el peroxisoma y en las mitocondrias (Hildebrandt *et al.*, 2015). También, recientemente Wenqian *et al.*, (2022) publicaron que esta proteína sería responsable de promover la elongación de ácidos grasos lineales desde C4 hasta C16 y corroborando su localización en los peroxisomas al tener una secuencia de orientación peroximal. Finalmente se ha informado la participación de esta enzima directa o indirectamente en la degradación de ácidos grasos de β oxidación y ciclo glioxilato (Moire *et al.*, 2004). Además se ha determinado que ECH1 participa directamente en el ciclo de β oxidación en la degradación de ácidos grasos insaturados con dobles enlaces *cis* en conjunto con enzimas adicionales (Goepfert *et al.*, 2006).

En base a nuestros resultados, demostramos que ECH1 presenta niveles de ARNm similares en *E. globulus* e híbrido. No así en *E. nitens*, el cual exhibe cambios significativos en sus niveles de transcritos, tanto por genotipo como por condición, donde existe evidencia de una disminución de transcritos en la condición ADH (Fig.5). Lo que sugiere que ECH1 podría desempeñar un rol importante en especies tolerantes al frío, ya que modula su expresión con la finalidad de disminuir la degradación de ácidos grasos insaturados, principalmente para aumentar la barrera extracelular como cutina y suberina; aumento de reserva de carbono y energía; reguladores de señalización de estrés; aumento de la fluidez,

mejorar integridad y función de membrana vegetal (Mei & Zheng 2020; Xunchao *et al.*, 2021).

La proteína Eucgr.J00363/AT5G41040 corresponde a la proteína feruloil-CoA transferasa (HHT1) requerida para la síntesis de suberina y cutina (Jin-ying *et al.*, 2009; Zhen *et al.*, 2022). Se ha demostrado que HHT1 es fundamental para la síntesis de suberina aromática en *Arabidopsis*, la cual al momento de suprimir este gen, reduce significativamente la cantidad de ferulato en la suberina, que en consecuencia altera la permeabilidad al estrés salino (Jin-Ying *et al.*, 2009). La supresión de un gen homólogo a HHT1 en *Solanum tuberosum*, provocó una reducción tanto del contenido de éster ferulato como ω -hidroxiácido graso en la suberina y cera, lo que en consecuencia resultó en una piel más gruesa y mayor pérdida de agua, sugiriendo que el déficit de compuestos aromáticos de suberina y cera se relaciona directa o indirectamente con la función de los polímeros lipídicos (Serra *et al.*, 2010). Avila *et al.*, (2018) demostró que esta proteína se ha visto infraexpresada en condiciones de estrés por congelamiento en etapas de recuperación (24h después del frío) en plantas de *Zea mays*. Resultados que son similares a los mostrados aquí, donde se observa que hay una tendencia a la disminución de HHT1 en los 3 genotipos, sin embargo no son significativos, exceptuando el control de *E. nitens* comparado con las demás condiciones. Además se puede observar que *E. globulus* e híbrido tienden a comportarse muy similar en comparación a *E. nitens*. Sin embargo, no se observan diferencias significativas y, por lo tanto, no se puede establecer una asociación con la tolerancia al frío (Fig. 5)

La proteína Eucgr.D01144/AT1G02205 corresponde a Eceriferum 1 (CER1) que codifica una supuesta aldehído descarboxilasa, encargada de la conversión de aldehídos a alcanos, lo que además lleva a la formación de alcoholes secundarios y cetonas (Aarts *et al.*, 1995; Bernard *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2003). En cuanto a su funcionalidad, se ha visto que al sobreexpresar CER1 provoca un aumento entre 24 y 32% en el contenido de cera total, con un mayor aumento en la cantidad de alcanos (90% en promedio) y una mayor resistencia al estrés por sequía. Al contrario, se muestran los mutantes deficientes de CER1, el cual mostró entre un 44 y 56% menos de contenido de cera en comparación al control (Rahman *et al.*, 2021).

Se ha documentado que el estrés por frío reduce significativamente las cantidades de alcanos de cadena muy larga (VLC) principalmente al disminuir la expresión de CER1 (Hongqi *et al.*, 2022). Al igual que lo publicado por Bourderx *et al.*, (2011) donde menciona que la transcripción de CER1 disminuyeron al ser expuestos a tratamientos a temperaturas congelantes y oscuridad. En otro estudio publicado por Yanmei *et al.*, (2020) se mostró que la sobreexpresión de CER1 en *Brassica napus* provocó un aumento de alcanos (C27, C28, C29 y C31), una disminución de alcoholes secundarios (C28 y C29) y cambios en los componentes de la cera. Finalmente CER1 al ser inducido por estrés por congelamiento (debajo de los 4°C) aumentó en un 164% su nivel de expresión en tratamiento al estrés (Junqing *et al.*, 2019).

Nuestros resultados demuestran que no existen diferencias significativas por condición, pero sí entre genotipos, como en el caso de *E. nitens* donde se observa una clara diferencia significativa en la abundancia de transcritos comparando con los otros genotipos en estudio y muestra cierta tendencia a aumentar sus niveles entre tratamiento (no significativo). Sin embargo, en *E. globulus e híbrido* se observa una tendencia a lo contrario, es decir una disminución de los transcritos en condición ADH (no significativos). Además existe evidencia significativa entre la abundancia de transcritos de CER1 entre *E. nitens* y *E. globulus* en tratamiento de ADH (Fig. 5). Por lo tanto, es evidente que la expresión y función de CER1 implicado en el estrés por frío provoca cambios relevantes en la cantidad total de cera cuticular (alcanos principalmente) y por lo tanto, una respuesta diferencial en respuesta al estrés al promover cambios en la composición cuticular.

El factor de transcripción WIN1/SHN1 (Wax inducer 1) Eucgr.C01178/At1G15360, familia de factores de transcripción AP2/ERF un activador transcripcional para regular la producción de ceras cuticulares y cutina (Guiping *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2011). Yang *et al.*, (2011) demostró que la inducción de cera cuticular confirió tolerancia a la sequía, correlacionandolo con el número reducido de estomas al momento de inducir la expresión del gen WIN1/SHN1. Por otra parte, se ha demostrado que este factor de transcripción es inducido fuertemente por diferentes tipos de estrés: hídrico, salino, frío y calor (Sarwar *et al.*, 2020; Djemal *et al.*, 2015; Djemal *et al.*, 2018;). En el estrés por frío un homólogo en Soya *Glycine max* GmWIN1-5 al ser sobreexpresado resultó en una mejora del aceite y un alto nivel de fosfolípidos involucrados en la formación de las

membranas celulares. Además se observa una menor fuga de electrolitos en comparación al tipo salvaje bajo estrés por frío (Guiping *et al.*, 2022). Djemal *et al.*, (2018) demostró que bajo estrés por frío y calor, la expresión de SHN1 fue fuertemente inducida (12 veces más), alcanzando su máximo a las 24h en comparación al control.

En base a estos estudios, nuestros resultados coinciden en que el factor de transcripción WIN1 tiende a sobreexpresarse en condición ADH en *E. nitens* e híbrido (no significativamente). Sin embargo, en *E. globulus* ocurre lo contrario, ya que existe una disminución significativa en sus niveles de transcritos en la condición ADH. Por lo tanto, estos resultados muestran que la cantidad de ARNm entre *E. globulus* y *E. nitens* son significativamente opuestos, debido a que en el genotipo susceptible generó una menor acumulación de transcritos WIN1 en comparación al genotipo tolerante a frío. Seguimos que WIN1 juega un rol importante mostrado por literatura como por nuestros resultados de qPCR (Fig. 5) y expresión digital y que podría relacionarse con cambios en la composición química de la cutícula, necesarios para conferir mayor tolerancia a temperaturas congelantes. Además en base a literatura, se sugiere que en *E. globulus* debería haber una menor concentración de fosfolípidos involucrados en la membrana celular y en consecuencia una mayor fuga de electrolitos que podría generar un estrés oxidativo y estrés hídrico en la célula provocando los efectos de estos estrés dentro de la célula.

Eucgr.D01841/AT5G41315 corresponde a un factor de transcripción glabra 3 (GL3/bHLH1,MYC6). Esta proteína es miembro de la superfamilia bHLH (basic helix-loop-helix) y se ha evidenciado que la sobreexpresión de GL3 resulta en la activación de la biosíntesis de antocianinas (Ramsay *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004). Resultados similares publicados por Petridis *et al* (2016), el cual demostró que mutantes deficientes de BEE1 y GFR, dos proteínas que actúan como regulador negativo de GL3. Provocaron una disminución en la acumulación de antocianinas durante el estrés por bajas temperaturas. Al igual que lo demostrado por Jian-fang *et al.*, (2019) donde MYC6 respondió al tratamiento al estrés por frío en tejido foliar, inclusive 12 horas posteriores al tratamiento.

En base a nuestros resultados sobre esta proteína podemos señalar de que existe una tendencia a la disminución en los niveles de expresión de GL3 tanto para *E. nitens* e híbrido entre tratamiento y control (no significativos). Sin embargo, para *E. nitens* existen diferencias significativas al comparar el tratamiento ADH entre los 3 genotipos (Fig. 5), existiendo un aumento en los niveles de ARNm de GL3/bHLH1/MYC6, al igual que lo demostrado por literatura, donde GL3 influye en la acumulación de antocianinas (pertenecientes al grupo de los flavonoides). Estos metabolitos secundarios están bien documentados sobre su participación en estrés por frío (Cristie *et al.*, 1994; Uddin *et al.*, 2015;). De hecho, se ha comprobado que la acumulación de antocianinas en bajas temperaturas, genera un aumento en la capacidad antioxidante y tolerancia a bajas temperaturas (Zhang *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2014).

Eucgr.G01417/AT4G34050 codifica para CCoAOMT1 cafeoil-coA-o-metiltransferasa 1, que desempeña un papel esencial en la biosíntesis de lignina de guayacilo (G) y sinapilo (S). Se ha observado que mutantes *ccoaomt1* muestran un fenotipo hipersensible al estrés por sal y sequía (Hyun jin *et al.*, 2019; Hyun jin *et al.*,2021). Además se ha demostrado que los genes de síntesis de fenilpropanoide y flavonoide tanto en control como en mutantes, estaban regulados al alza por estrés a bajas temperaturas, exceptuando CCoAOMT1 que no presentó diferencias significativas (Petridis *et al.*,2016). Sin embargo, en el estudio publicado por Ployet *et al.*, (2018) demostró que el factor de transcripción MYB137 (ausencia de ortólogos en *Arabidopsis*) es inducido significativamente por frío, donde posteriormente se extrajo la red de coexpresión de esta proteína y se determinó que coexpresan con 5 genes reguladores de la pared secundaria y uno de ellos era gen de biosíntesis de lignina CCoAOMT1 que respalda su participación en respuesta a estrés por frío en *Eucalyptus*.

Por lo tanto, informamos que tanto en la expresión digital como en qPCR muestran una tendencia entre los 3 genotipos en un aumento transversal en sus niveles de transcripción entre NA y ADH pero, no son significativos. Sin embargo, *E.globulus* presenta un notable aumento de transcrito entre el control y el tratamiento ADH. Nuestros resultados indican que CCoAOMT1 se induce fuertemente en el genotipo sensible al estrés por frío (*E. globulus*) y no así en especies más resistentes a esta condición. No obstante, aún no se tiene con claridad la función que cumple en este tipo de estrés. Antecedentes previos muestran que en mutantes knock out de *ccoaomt1* provoca una hipersensibilidad a la sequía y una mayor acumulación de

ROS, sugiriendo una regulación de H₂O₂ en respuesta a sequía (Hyun jin *et al.*,2021), hecho que también ocurre en estrés por frío, donde generalmente deriva en un estrés por sequía debido a la cristalización del agua dentro de la célula. Suceso que podría ser una de las razones del aumento transversal de esta proteína en los 3 genotipos.

En base a todos estos resultados tanto de análisis *in silico* como qPCR podemos concluir que en la mayoría de los genes comprobados existe una diferencia entre especie tolerante como *E. nitens* en comparación a susceptible para el caso de *E. globulus*. Sin embargo, curiosamente el híbrido tendió a comportarse de manera similar al genotipo susceptible, en sus niveles de transcrito en qPCR y distinto a los resultados de análisis *in silico* ya que hubo mayor cercanía entre los resultados de *E. nitens* e híbrido.

4. 5 Impacto del frío en la expresión génica asociados a cutícula

Los lípidos de la cutícula vegetal se sintetizan a través de una serie de reacciones biológicas complejas en las que están involucradas múltiples enzimas, proteínas y factores de transcripción. Identificamos un total de 422 proteínas anotadas con *E. grandis* que al ser anotadas con *A. thaliana* para análisis de gene ontology obtuvimos 188 proteínas (Anexo 9). De las cuales, 54 corresponden a factores de transcripción (29% aprox.), 38 genes de interacción proteína-proteína, las cuales coinciden con las 134 proteínas

que actúan directamente en la síntesis de cutícula (71%). Además dentro de los 54 factores de transcripción, estos forman parte de 22 familias, dentro de las que destacan 18 MYB, 3 NAC, 7 BHLH, 2 WRKY, 5 AP2-EREBP, entre otros.

En cuanto a la anotación de gene ontology destacamos que existe 29 términos de proceso biológico (BP), dentro de las más relevantes para este estudio fueron los de metabolismo de cera, biosíntesis y catabolismo de ácidos grasos, regeneración de pared secundaria, entre otros.

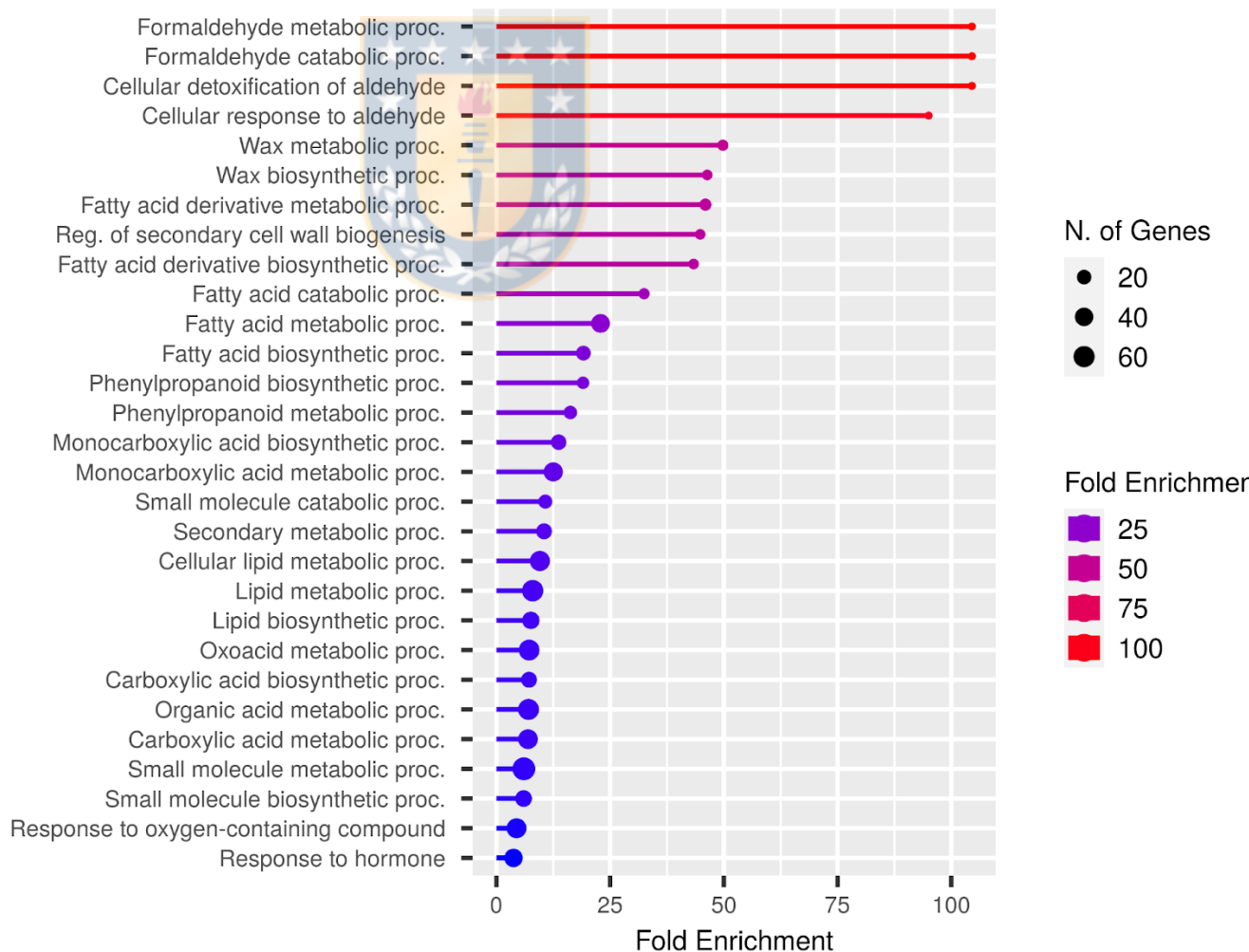


Fig 6: Análisis de Gene ontology por proceso biológico (BP) de 188 proteínas de síntesis cuticular. Valores p.ajustado indicando tasa de falsos positivos (FDR). Por lo tanto, el color rojo indica un alto enriquecimiento y el color azul un bajo enriquecimiento. Para todos los casos, se utilizó un valor pvalue y FDR de 0,05.

El análisis de gene ontology se llevó a cabo con Clusterprofiler donde se buscó determinar el proceso biológico en el que participan 188 proteínas en estudio, de esta manera se realizó el análisis de sobrerrepresentación que busca determinar el porcentaje de genes expresados diferencialmente en el término GO, utilizando como entrada las 188 proteínas versus la lista de background. De esta manera, se evalúa qué genes de nuestra lista se pueden encontrar no de forma azarosa en el background al comparar nuestra lista de genes expresados diferencialmente con la lista de diferentes grupos de genes expresados diferencialmente en el background (reportados por literatura, experimentos, etc. a través de valores p.ajustados). Por lo tanto, a raíz de este análisis se estableció que las 188 proteínas se asocian a 400 características GO (Fig. 6), dentro de las cuales, se publican un total de 39 asociaciones por BP. Dentro de este conjunto de ontologías destacamos las más relevantes para nuestro estudio: “response to cold” con 11 genes asociados a esta vía; “response to water deprivation” con 14 genes; “response to salt stress” con 16 genes; “Cuticle development” con 7 genes; “Wax metabolic process” con 10 genes, entre otros. Destacamos genes relacionados a respuesta a frío, entre ellos factores de transcripción tales como CBF1, CBF2, WRK33 reportados como activadores de genes de tolerancia al frío (Blanco *et al.*, 2005; Sakuma *et al.*, 2002; Jiang &

Deyholos 2009) y otras enzimas como Acetil-coA carboxilasa 1 (ACC1), Alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1), varios miembros de la familia KCS: KCS3, KCS6, KCS9, KCS11 y KCS21 (Amid *et al.*, 2012; Millar *et al.*, 1994; Jarillo *et al.*, 1993; Juyoung *et al.*, 2013) y un transportador ERD6 (Kiyosue *et al.*, 1998). Además se observan varias rutas relacionadas a síntesis de cadena larga de ácidos grasos, síntesis de cutina, cera y cutícula, entre otros (fig. 6).



4.6 Red de regulación génica de síntesis cuticular

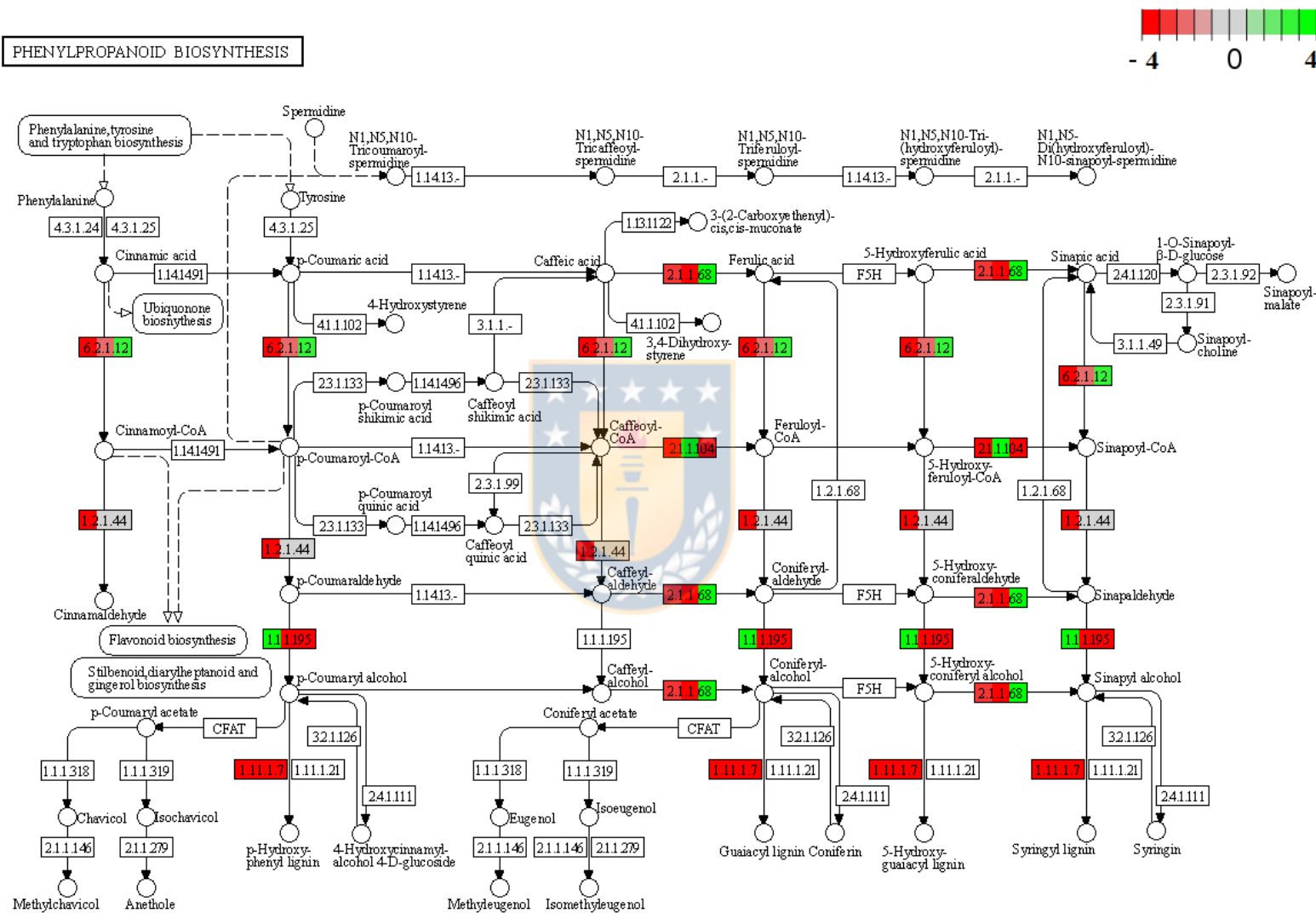


Figura 7: Red de regulación génica de 188 proteínas expresadas diferencialmente en la condición ADH para los tres genotipos en estudio. Cada rectángulo representa la enzima que participa en la red y cada uno de ellos está representado por los tres genotipos en el siguiente orden de izquierda a derecha: híbrido, *E. globulus* y *E. nitens*.

Dentro de la red de regulación génica podemos encontrar diferencias principalmente en la ruta de síntesis de fenilpropanoides, el cuál es una vía que converge en múltiples funciones dentro de las plantas y se encuentra asociada principalmente a metabolitos secundarios, que son a menudo constituyentes de las cutinas y ceras cuticulares (Tafolla *et al.*, 2017), como ésteres derivados de ácido cinámico y ácidos grasos de cadena larga o alcoholes grasos. Estos ésteres incluyen una amplia variedad de restos fenilpropanoides de longitud de cadena de C16 a C30 (Lee *et al.*, 2004). Sumado a esto, se ha evidenciado que la formación de lípidos cuticulares precede principalmente de la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides (André *et al.*, 2022; Mintz *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran diferencias en la expresión de las proteínas que participan en esta vía, algunas de ellas: 4-coumarate CoA 4CL1 (6.2.1.12), donde se observa que son contrastantes los valores de expresión entre el híbrido y *E.globulus* versus *E. nitens*, similares a los obtenidos por 4CCL9 de qPCR procedentes de la misma familia (Fig.5). Por otra parte, la proteína O-metiltransferasa 1 (COMT1) (2.1.1.68) la cual se ha observado en plantas de *A. thaliana* ecotipo Sha (crecimiento óptimo a 15°C), participa tanto en la ruta de síntesis de lignina como de flavonoides, donde al momento de realizar análisis de expresión diferencial, mostró una regulación a la baja en sus niveles de transcritos a los 15°C, lo que se presume que podría favorecer la ruta de flavonoides, los cuales son determinantes en la tolerancia a la congelación y aclimatación al frío (Duruflé *et al.*, 2017; Schulz *et al.*, 2016). Finalmente, nuestra red de regulación genética muestra resultados similares, donde híbrido y *E. globulus* presentan una disminución de

transcritos distinta a los de *E. nitens* en la condición ADH (fig.7). Por lo tanto, nuestros resultados muestran la compleja red de síntesis de cutícula donde los niveles de expresión difieren entre genotipo tolerante y sensible al estrés por frío. Además de ofrecer un amplio y desconocido número de genes aún sin caracterizar, donde tienen implicancias directa e indirectamente en la regulación de síntesis de cutícula.



V. CONCLUSION

El estrés por frío varía ampliamente en severidad y efecto. La exposición de las plantas de *Eucalyptus spp.* a temperaturas congelantes (ADH) durante 4 días con temperaturas oscilantes entre -2°C y 8° provocan cambios en la acumulación de transcritos que varían entre genotipos tolerantes y sensibles, esto evidenciado tanto por análisis bioinformáticos como por qPCR. En este trabajo pudimos identificar un total de 188 genes anotados con *A. thaliana* y 422 genes anotados con *E. grandis* que demuestra que existen muchos genes de esta especie leñosa que aún no han sido caracterizados para comprender el funcionamiento en esta red de regulación de síntesis cuticular en temperatura congelantes. Por lo tanto, se marca un precedente de la gran cantidad de genes que participan en esta red, mucho mayor a los reportados por literatura en plantas de *Eucalyptus spp.* asociados a estrés por frío. Sin embargo, aún es necesaria mayor evidencia para respaldar los resultados *in silico* y por qPCR obtenidos en este trabajo, ya que no se pudo establecer diferencias significativas entre la acumulación de transcritos en la síntesis de cutícula entre individuos tolerantes y sensibles a congelación con los resultados de qPCR.

Finalmente, se plantea que la baja calidad de secuenciación de *E. nitens*, la gran cantidad de genes que no se han caracterizado correctamente para la anotación con *E. grandis* y *A. thaliana* pueden ser claves al momento de la validación de los resultados *in silico* obtenidos en este trabajo.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aarts, M. G., Keijzer, C. J., Stiekema, W. J., & Pereira, A. (1995). Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *The Plant Cell*, 7(12), 2115-2127.
- Aguayo, P., Sanhueza, J., Noriega, F., Ochoa, M., Lefeuvre, R., Navarrete, D., Fernández, M & Valenzuela, S. (2016). Overexpression of an SKn-dehydrin gene from Eucalyptus globulus and Eucalyptus nitens enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Trees* 30(5): 1785-1797.
- Ahmed, N. U., Park, J.-I., Jung, H.-J., Hur, Y., & Nou, I.-S. (2015). Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in Brassica rapa. *Functional & Integrative Genomics*, 15(4), 383-394. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0427-7>
- Albert, Z., Ivanics, B., Molnár, A., Miskó, A., Tóth, M., & Papp, I. (2013). Candidate genes of cuticle formation show characteristic expression in the fruit skin of apple. *Plant Growth Regulation*, 70(1), 71-78. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9779-y>
- Arias, M. (2016). Caracterización química de la cutícula foliar de Eucalyptus spp. Por espectroscopia infrarroja FTIR y expresión de genes en respuesta a la aclimatación a baja temperatura. Universidad de Concepción
- Amid, A., Lytovchenko, A., Fernie, A. R., Warren, G., & Thorlby, G. J. (2012). The sensitive to freezing3 mutation of Arabidopsis thaliana is a cold-sensitive allele of homomeric acetyl-CoA carboxylase that results in cold-induced cuticle deficiencies. *Journal of experimental botany*, 63(14), 5289-5299.
- André, C. M., Guerriero, G., Lateur, M., Charton, S., Leclercq, C. C., Renaut, J., Hausman, J.-F., & Legay, S. (2022). Identification of Novel Candidate Genes Involved in Apple Cuticle Integrity and Russeting-Associated

Triterpene Synthesis Using Metabolomic, Proteomic, and Transcriptomic Data. *Plants*, 11(3), 289. <https://doi.org/10.3390/plants11030289>

Alonso-Blanco, C., Gomez-Mena, C., Llorente, F., Koornneef, M., Salinas, J., & Martínez-Zapater, J. M. (2005). Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(3), 1304-1312. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068510>

Avila, L. M., Obeidat, W., Earl, H., Niu, X., Hargreaves, W., & Lukens, L. (2018). Shared and genetically distinct *Zea mays* transcriptome responses to ongoing and past low temperature exposure. *BMC Genomics*, 19, 761. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5134-7>

Allen, C. D., Breshears, D. D., and McDowell, N. G. (2015). On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 6, art129. doi:10.1890/ES15-00203.1.

Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., et al. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manag.* 259, 660–684. doi:10.1016/j.foreco.2009.09.001.

Bai, J., Wang, Y., Guo, L., Guo, X., Guo, H., Yuan, S., Duan, W., Liu, Z., Zhao, C., Zhang, F., & Zhang, L. (2019). Genomic identification and characterization of MYC family genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 20(1), 1032. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6373-y>

Baltierra, F., Castillo, M., Gamboa, M. C., Rothhammer, M., and Krauskopf, E. (2013). Molecular characterization of a novel Na⁺/H⁺ antiporter cDNA from *Eucalyptus globulus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 535–540. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.118.

Battaglia, M., Beadle, C., and Loughhead, S. (1996). Photosynthetic temperature responses of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. *Tree Physiol.* 16, 81–89. doi:10.1093/treephys/16.1-2.81.

- 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.
- Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Jetter, R., Renne, C., Faure, J.-D., Haslam, R. P., Napier, J. A., Lessire, R., & Joubès, J. (2012). Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex[C][W]. *The Plant Cell*, 24(7), 3106-3118. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099796>
- Borisjuk, N., Hrmova, M., and Lopato, S. (2014). Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnol. Adv.* 32, 526–540. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.01.005.
- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., et al. (2011). Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 Promotes Wax Very-Long-Chain Alkane Biosynthesis and Influences Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses1[W]. *Plant Physiol.* 156, 29–45. doi:10.1104/pp.111.172320.
- Bourgault, R., Matschi, S., Vasquez, M., Qiao, P., Sonntag, A., Charlebois, C., Mohammadi, M., Scanlon, M. J., Smith, L. G., & Molina, I. (2020). Constructing functional cuticles: Analysis of relationships between cuticle lipid composition, ultrastructure and water barrier function in developing adult maize leaves. *Annals of Botany*, 125(1), 79-91. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz143>
- Bryant, P. H., and Trueman, S. J. (2015). Stem Anatomy and Adventitious Root Formation in Cuttings of Angophora, Corymbia and Eucalyptus. Available at: /paper/Stem-Anatomy-and-Adventitious-Root-Formation-in-of-Bryant-Trueman/72812dbcf69a2caf2209a09b27dd33d5cb55e3e0 [Accessed July 30, 2019].
- Buda, G. J., Isaacson, T., Matas, A. J., Paolillo, D. J., and Rose, J. K. C. (2009). Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *Plant J.* 60, 378–385. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03960.x.

- 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>
- Cai, G., Liu, B., Zhou, Y., Gao, H., Xue, J., Ji, C., Zhang, L., Jia, X., & Li, R. (2022). Functional characterization of transcription factor WIN1 genes associated with lipid biosynthesis and stress tolerance in soybean (*Glycine max*). *Environmental and Experimental Botany*, 200, 104916. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104916>
- Camoirano, A., Arce, A. L., Ariel, F. D., Alem, A. L., Gonzalez, D. H., & Viola, I. L. (2020). Class I TCP transcription factors regulate trichome branching and cuticle development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 71(18), 5438-5453. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa257>
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology: FPB*, 30(3), 239-264. <https://doi.org/10.1071/FP02076>
- Chen, Y., Lun, A. T. L., & Smyth, G. K. (2016). From reads to genes to pathways: Differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research*, 5, 1438. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8987.2>
- Chen, X., Goodwin, S. M., Boroff, V. L., Liu, X., & Jenks, M. A. (2003). Cloning and Characterization of the WAX2 Gene of Arabidopsis Involved in Cuticle Membrane and Wax Production. *The Plant Cell*, 15(5), 1170-1185. <https://doi.org/10.1105/tpc.010926>
- Christie, P. J., Alfenito, M. R., & Walbot, V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194(4), 541-549.

- Chun, H. J., Baek, D., Cho, H. M., Lee, S. H., Jin, B. J., Yun, D.-J., Hong, Y.-S., & Kim, M. C. (2019). Lignin biosynthesis genes play critical roles in the adaptation of Arabidopsis plants to high-salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 14(8), 1625697. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1625697>
- Chun, H. J., Baek, D., Jin, B. J., Cho, H. M., Park, M. S., Lee, S. H., Lim, L. H., Cha, Y. J., Bae, D.-W., Kim, S. T., Yun, D.-J., & Kim, M. C. (2021). Microtubule Dynamics Plays a Vital Role in Plant Adaptation and Tolerance to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5957. <https://doi.org/10.3390/ijms22115957>
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444–451. doi:10.1016/j.tplants.2007.07.002.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.-K., & Sunkar, R. (2010). Gene Regulation During Cold Stress Acclimation in Plants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 639, 39-55. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_3
- Close, D. C. (2001). Cold-induced photoinhibition, pigment chemistry, growth and nutrition of *Eucalyptus nitens* and *E. globulus* seedlings during establishment. Available at: <https://eprints.utas.edu.au/19109/> [Accessed July 31, 2022].
- De Santana Costa, M. G., Mazzafera, P., and Balbuena, T. S. (2017). Insights into temperature modulation of the *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* antioxidant and lignification subproteomes. *Phytochemistry* 137, 15–23. doi:10.1016/j.phytochem.2017.01.017.
- De Vries, S., Fürst-Jansen, J. M. R., Irisarri, I., Dhabalia Ashok, A., Ischebeck, T., Feussner, K., Abreu, I. N., Petersen, M., Feussner, I., & de Vries, J. (2021). The evolution of the phenylpropanoid pathway entailed pronounced radiations and divergences of enzyme families. *The Plant Journal*, 107(4), 975-1002. <https://doi.org/10.1111/tpj.15387>

- Dennis, E. S., Sachs, M. M., Gerlach, W. L., Finnegan, E. J., & Peacock, W. J. (1985). Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase 2 (Adh2) gene of maize. *Nucleic Acids Research*, 13(3), 727-743.
- Djema, R., & Khoudi, H. (2015). Isolation and molecular characterization of a novel WIN1/SHN1 ethylene-responsive transcription factor TdSHN1 from durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. Durum). *Protoplasma*, 252(6), 1461-1473. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0775-8>
- Djema, R., Mila, I., Bouzayen, M., Pirrello, J., & Khoudi, H. (2018). Molecular cloning and characterization of novel WIN1/SHN1 ethylene responsive transcription factor HvSHN1 in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 228, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.019>
- Durufié, H., Hervé, V., Ranocha, P., Balliau, T., Zivy, M., Chourré, J., San Clemente, H., Burlat, V., Albenne, C., Déjean, S., Jamet, E., & Dunand, C. (2017). Cell wall modifications of two *Arabidopsis thaliana* ecotypes, Col and Sha, in response to sub-optimal growth conditions: An integrative study. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 263, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.015>
- Espina A. 2006. Densidad básica de la madera de *Eucalyptus globulus* en dos sitios en Chile. Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 25 p
- Fernández, M., Villarroel, C., Balbontín, C., & Valenzuela, S. (2010). Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. *Trees*, 24(6), 1109-1116.
- 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.
- 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>

- 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.
- Gasparini, P., Cascione, L., Fassan, M., Lovat, F., Guler, G., Balci, S., ... & Huebner, K. (2014). microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget*, 5(5), 1174
- Grattapaglia, D., Vaillancourt, R. E., Shepherd, M., Thumma, B. R., Foley, W., Külheim, C., et al. (2012). Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genet. Genomes* 8, 463–508. doi:10.1007/s11295-012-0491-x.
- Goepfert, S., Hiltunen, J. K., & Poirier, Y. (2006). Identification and Functional Characterization of a Monofunctional Peroxisomal Enoyl-CoA Hydratase 2 That Participates in the Degradation of Even cis-Unsaturated Fatty Acids in *Arabidopsis thaliana**. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35894-35903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606383200>
- Gou, J.-Y., Yu, X.-H., & Liu, C.-J. (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18855-18860. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905555106>
- Guan, L., Denkert, N., Eisa, A., Lehmann, M., Sjuts, I., Weiberg, A., Soll, J., Meinecke, M., & Schwenkert, S. (2019). JASSY, a chloroplast outer membrane protein required for jasmonate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10568-10575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900482116>
- Guzmán, P., Fernández, V., Graça, J., Cabral, V., Kayali, N., Khayet, M., et al. (2014). Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00481.

- Harfouche, A., Meilan, R., and Altman, A. (2014). Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree Physiol.* 34, 1181–1198. doi:10.1093/treephys/tpu012.
- Haitao, S., W, L., Y, Y., Y, W., & Z, C. (2017). Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in Arabidopsis. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.05.013>
- Hawkins, C., Ginzburg, D., Zhao, K., Dwyer, W., Xue, B., Xu, A., Rice, S., Cole, B., Paley, S., Karp, P., & Rhee, S. Y. (2021). Plant Metabolic Network 15: A resource of genome-wide metabolism databases for 126 plants and algae. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(11), 1888-1905. <https://doi.org/10.1111/jipb.13163>
- He, M., He, C.-Q., and Ding, N.-Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.01771.
- He, J., Tang, S., Yang, D., Chen, Y., Ling, L., Zou, Y., Zhou, M., & Xu, X. (2019). Chemical and Transcriptomic Analysis of Cuticle Lipids under Cold Stress in *Thellungiella salsuginea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4519. <https://doi.org/10.3390/ijms20184519>
- He, M., & Ding, N.-Z. (2020). Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.562785>
- Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., & Braun, H.-P. (2015). Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8(11), 1563-1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Heredia-Guerrero, J. A., Benítez, J. J., Domínguez, E., Bayer, I. S., Cingolani, R., Athanassiou, A., et al. (2014). Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00305.

- Instituto forestal (INFOR). 2021. Anuario forestal, 2021. Citado el 31/08/2022. Disponible en: “INSTITUTO FORESTAL. (2018).ANUARIO FORESTAL 2021
- Ipinza, R., Barros, S., Gutiérrez, B., Borralho, N.(2014). Mejoramiento genético de Eucaliptos en Chile.
- Jarillo, J. A., Leyva, A., Salinas, J., & Martinez-Zapater, J. M. (1993). Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant. *Plant Physiology*, *101*(3), 833-837.
- Jiang, Y., & Deyholos, M. K. (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*, *69*(1), 91-105. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9408-3>
- Joubès, J., and Domergue, F. (2018). “Biosynthesis of the Plant Cuticle,” in *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.*, ed. H. Wilkes (Cham: Springer International Publishing), 1–19. doi:10.1007/978-3-319-54529-5_8-1.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., & Tanabe, M. (2021). KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D545-D551. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>
- Keller, G., Cao, P. B., San Clemente, H., El Kayal, W., Marque, C., and Teulières, C. (2013). Transcript profiling combined with functional annotation of 2,662 ESTs provides a molecular picture of *Eucalyptus gunnii* cold acclimation. *Trees* *27*, 1713–1735. doi:10.1007/s00468-013-0918-5.
- Kienow, L., Schneider, K., Bartsch, M., Stuible, H.-P., Weng, H., Miersch, O., Wasternack, C., & Kombrink, E. (2008). Jasmonates meet fatty acids: Functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from

- Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 403-419. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm325>
- Kim, J., Jung, J. H., Lee, S. B., Go, Y. S., Kim, H. J., Cahoon, R., Markham, J. E., Cahoon, E. B., & Suh, M. C. (2013). Arabidopsis 3-Ketoacyl-Coenzyme A Synthase9 Is Involved in the Synthesis of Tetracosanoic Acids as Precursors of Cuticular Waxes, Suberins, Sphingolipids, and Phospholipids1[W]. *Plant Physiology*, 162(2), 567-580. <https://doi.org/10.1104/pp.112.210450>
- Kiyosue, T., Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1370(2), 187-191. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00007-8)
- Kube, P. D., Raymond, C. A., & Banham, P. W. (2001). Genetic parameters for diameter, basic density, cellulose content and fibre properties for Eucalyptus nitens. *Forest Genetics*, 8(4), 285-294.
- Kube, P. D., Raymond, C. A., Kube, P. D., and Raymond, C. A. (2002). Breeding to minimize the effects of collapse in Eucalyptus nitens. Available at: /paper/Breeding-to-minimize-the-effects-of-collapse-in-Kube-Raymond/c5d5692b57febae42c6961a3c0abf155404d3c5c [Accessed July 31, 2022].
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- Lee, J.-Y., Yoon, J.-W., Kim, C.-T., & Lim, S.-T. (2004). Antioxidant activity of phenylpropanoid esters isolated and identified from Platycodon grandiflorum A. DC. *Phytochemistry*, 65(22), 3033-3039. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.030>
- Legay, S., Guerriero, G., Deleruelle, A., Lateur, M., Evers, D., André, C. M., & Hausman, J.-F. (2015). Apple russetting as seen through the RNA-seq lens: Strong alterations in the exocarp cell wall. *Plant Molecular Biology*, 88(1), 21-40. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0303-4>

- 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>
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., ... Ohlrogge, J. (2013). Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book*, 2013(11). <https://doi.org/10.1199/tab.0161>
- Liu, W., Wang, Q., Zhang, R., Liu, M., Wang, C., Liu, Z., Xiang, C., Lu, X., Zhang, X., Li, X., Wang, T., Gao, L., & Zhang, W. (2022). Rootstock-scion exchanging mRNAs participate in the pathways of amino acid and fatty acid metabolism in cucumber under early chilling stress. *Horticulture Research*, 9, uhac031. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac031>
- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J., & Pallen, M. J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology*, 30(5), 434-439. <https://doi.org/10.1038/nbt.2198>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ma, X., Wang, P., Zhou, S., Sun, Y., Liu, N., Li, X., & Hou, Y. (2015). De novo transcriptome sequencing and comprehensive analysis of the drought-responsive genes in the desert plant *Cynanchum komarovii*. *BMC Genomics*, 16(1), 753. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1873-x>
- 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>

- Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C., & Kunst, L. (1999). CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *The Plant Cell*, *11*(5), 825-838.
- Moire, L., Rezzonico, E., Goepfert, S., & Poirier, Y. (2004). Impact of Unusual Fatty Acid Synthesis on Futile Cycling through β -Oxidation and on Gene Expression in Transgenic Plants. *Plant Physiology*, *134*(1), 432-442. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032938>
- Myint, T., Ismawanto, S., Namasivayam, P., Napis, S., & Abdulla, M. P. (s. f.). Expression Analysis of the ADH Genes in Arabidopsis Plants Exposed to PEG-induced Water Stress. *World Journal of Agricultural Research*, *9*.
- Miranda, I., Almeida, M. H., & Pereira, H. (2001). Provenance and site variation of wood density in *Eucalyptus globulus* Labill. at harvest age and its relation to a non-destructive early assessment. *Forest Ecology and Management*, *149*(1-3), 235-240.
- Mintz-Oron, S., Mandel, T., Rogachev, I., Feldberg, L., Lotan, O., Yativ, M., Wang, Z., Jetter, R., Venger, I., Adato, A., & Aharoni, A. (2008). Gene Expression and Metabolism in Tomato Fruit Surface Tissues. *Plant Physiology*, *147*(2), 823-851. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116004>
- Moraga S., P., Escobar, R., & Valenzuela A., S. (2006). Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. *Electronic Journal of Biotechnology*, *9*(3), 0-0.
- Muñoz, F., Espinosa, M., Herrera, M. A., and Cancino, J. (2005). Características del crecimiento en diámetro, altura y volumen de una plantación de *Eucalyptus nitens* sometida a tratamientos silvícolas de poda y raleo. *Bosque Valdivia* *26*, 93–99. doi:10.4067/S0717-92002005000100009.
- 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.

Navarro, M., Ayax, C., Martinez, Y., Laur, J., Kayal, W. E., Marque, C., et al. (2011). Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. *Plant Biotechnol. J.* 9, 50–63. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00530.x.

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.

O'Neil, S. T., & Emrich, S. J. (2013). Assessing De Novo transcriptome assembly metrics for consistency and utility. *BMC Genomics*, 14(1), 465. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-465>

Pareek, A., Khurana, A., K Sharma, A., & Kumar, R. (2017). An overview of signaling regulons during cold stress tolerance in plants. *Current genomics*, 18(6), 498-511.

Prado, D., Antonio, J., & Barros, A. (1989). *Eucalyptus*: principios de silvicultura y manejo.

Petridis, A., Döll, S., Nichelmann, L., Bilger, W., & Mock, H.-P. (2016). *Arabidopsis thaliana* G2-LIKE FLAVONOID REGULATOR and BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION1 are low-temperature regulators of flavonoid accumulation. *New Phytologist*, 211(3), 912-925. <https://doi.org/10.1111/nph.13986>

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.

Ployet, R., Soler, M., Carocha, V., Ladouce, N., Alves, A., Rodrigues, J.-C., Harvengt, L., Marque, C., Teulieres, C., Grima-Pettenati, J., & Mounet,

- F. (2018). Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in Eucalyptus. *Tree Physiology*, 38(3), 409-422. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx062>
- Podpečan, V., Lavrač, N., Mozetič, I., Novak, P. K., Trajkovski, I., Langohr, L., & Gruden, K. (2011). SegMine workflows for semantic microarray data analysis in Orange4WS. *BMC bioinformatics*, 12(1), 416.
- Rahman, T., Shao, M., Pahari, S., Venglat, P., Soolanayakanahally, R., Qiu, X., Rahman, A., & Tanino, K. (2021). Dissecting the Roles of Cuticular Wax in Plant Resistance to Shoot Dehydration and Low-Temperature Stress in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1554. <https://doi.org/10.3390/ijms22041554>
- Ramsay, N. A., Walker, A. R., Mooney, M., & Gray, J. C. (2003). Two basic-helix-loop-helix genes (MYC-146 and GL3) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant. *Plant Molecular Biology*, 52(3), 679-688. <https://doi.org/10.1023/a:1024852021124>
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., & Babujee, L. (2004). AraPeroX. A Database of Putative *Arabidopsis* Proteins from Plant Peroxisomes. *Plant Physiology*, 136(1), 2587-2608. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043695>
- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal*, 23(2), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rubilar, R. A., Lee Allen, H., Fox, T. R., Cook, R. L., Albaugh, T. J., and Campoe, O. C. (2018). Advances in Silviculture of Intensively Managed Plantations. *Curr. For. Rep.* 4, 23–34. doi:10.1007/s40725-018-0072-9.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain

of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 998-1009. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6299>

Sarwar, M. B., Ahmad, Z., Anicet, B. A., Sajid, M., Rashid, B., Hassan, S., Ahmed, M., & Husnain, T. (2020). Identification and validation of superior housekeeping gene(s) for qRT-PCR data normalization in *Agave sisalana* (a CAM-plant) under abiotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(3), 567-584. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00760-y>

Schneider, K., Kienow, L., Schmelzer, E., Colby, T., Bartsch, M., Miersch, O., Wasternack, C., Kombrink, E., & Stuible, H.-P. (2005). A New Type of Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Synthetase from *Arabidopsis thaliana* Has the Catalytic Capacity to Activate Biosynthetic Precursors of Jasmonic Acid *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13962-13972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413578200>

Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A. R., & Hinch, D. K. (2016). Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 6, 34027. <https://doi.org/10.1038/srep34027>

Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., & Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *The Plant Journal*, 62(2), 277-290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04144.x>

Sharma, M., & Laxmi, A. (2016). Jasmonates: Emerging Players in Controlling Temperature Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01129>

Singh, S., Das, S., & Geeta, R. (2018). Role of Cuticular Wax in Adaptation to Abiotic Stress: A Molecular Perspective. En S. M. Zargar & M. Y. Zargar (Eds.), *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants:*

An Omics Perspective (pp. 155-182). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-7479-0_5

Shockey, J., & Browse, J. (2011). Genome-level and biochemical diversity of the acyl-activating enzyme superfamily in plants. *The Plant Journal*, 66(1), 143-160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04512.x>

Song, Y., Liu, L., & Ma, X. (2019). CbADH1 improves plant cold tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 14(7), 1612680. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1612680>

Solís, M., Salas, A., Lagos, C., Valenzuela, S., Emhart, V., & Fernández, M. (2019). De Novo Transcriptome Assembly of Eucalyptus nitens and the Expression of R2R3-MYB Genes in Response to Cold Acclimation in Eucalyptus Spp. *Plant Molecular Biology Reporter*, 37(4), 376-388. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01160-7>

Suh, M. C., Samuels, A. L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J., et al. (2005). Cuticular Lipid Composition, Surface Structure, and Gene Expression in Arabidopsis Stem Epidermis. *Plant Physiol.* 139, 1649–1665. doi:10.1104/pp.105.070805.

Tafolla-Arellano, J. C., Zheng, Y., Sun, H., Jiao, C., Ruiz-May, E., Hernández-Oñate, M. A., González-León, A., Báez-Sañudo, R., Fei, Z., Domozych, D., Rose, J. K. C., & Tiznado-Hernández, M. E. (2017). Transcriptome Analysis of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit Epidermal Peel to Identify Putative Cuticle-Associated Genes. *Scientific Reports*, 7, 46163. <https://doi.org/10.1038/srep46163>

Teulières, C., Bossinger, G., Moran, G., and Marque, C. *Stress Studies in Eucalyptus*. 19.

Trincado V, G., Quezada P, R., and von Gadow, K. (2003). A comparison of two stand table projection methods for young Eucalyptus nitens (Maiden) plantations in Chile. *For. Ecol. Manag.* 180, 443–451. doi:10.1016/S0378-1127(02)00611-4.

- Trivedi, P., Nguyen, N., Hykkerud, A. L., Häggman, H., Martinussen, I., Jaakola, L., & Karppinen, K. (2019). Developmental and Environmental Regulation of Cuticular Wax Biosynthesis in Fleshy Fruits. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00431>
- 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>
- Wang, Y., Jin, S., Xu, Y., Li, S., Zhang, S., Yuan, Z., Li, J., & Ni, Y. (2020). Overexpression of BnKCS1-1, BnKCS1-2, and BnCER1-2 promotes cuticular wax production and increases drought tolerance in *Brassica napus*. *The Crop Journal*, 8(1), 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.04.006>
- Wang, Z.-Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.-K., and Zhu, J. (2011). The Plant Cuticle Is Required for Osmotic Stress Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis and Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis*[W]. *Plant Cell* 23, 1971–1984. doi:10.1105/tpc.110.081943.
- Warren, G. J. (1998). Cold stress: Manipulating freezing tolerance in plants. *Curr. Biol.* 8, R514–R516. doi:10.1016/S0960-9822(07)00335-1.
- Wu, H., Liu, L., Chen, Y., Liu, T., Jiang, Q., Wei, Z., Li, C., & Wang, Z. (2022). Tomato SICER1–1 catalyzes the synthesis of wax alkanes, increasing drought tolerance and fruit storability. *Horticulture Research*, 9, uhac004. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac004>
- Wu, T. D., & Watanabe, C. K. (2005). GMAP: A genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics*, 21(9), 1859-1875. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti310>
- White, D. (1996). Physiological responses to drought of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* in plantations. Available at: <https://eprints.utas.edu.au/17453/> [Accessed July 31, 2022].

- Xu, Y., Wu, H., Zhao, M., Wu, W., Xu, Y., & Gu, D. (2016). Overexpression of the transcription factors GmSHN1 and GmSHN9 differentially regulates wax and cutin biosynthesis, alters cuticle properties, and changes leaf phenotypes in *Arabidopsis*. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 587.
- Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 515–527. doi:10.1051/agro/2009050.
- Yang, J., Isabel Ordiz, M., Jaworski, J. G., & Beachy, R. N. (2011). Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in *Arabidopsis* by changes in development of stomata. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(12), 1448-1455. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.09.006>
- Yeats, T. H., Martin, L. B. B., Viart, H. M.-F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., et al. (2013). The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat. Chem. Biol.* 8, 609–611. doi:10.1038/nchembio.960.
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., & He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Yuan, Z., Yang, H., Pan, L., Zhao, W., Liang, L., Gatera, A., Tucker, M. R., & Xu, D. (2022). Systematic identification and expression profiles of the BAHD superfamily acyltransferases in barley (*Hordeum vulgare*). *Scientific Reports*, 12(1), 5063. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08983-7>
- Yuan, P., Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2018). Calcium Signaling-Mediated Plant Response to Cold Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3896. <https://doi.org/10.3390/ijms19123896>
- Zhang, Q., Zhai, J., Shao, L., Lin, W., & Peng, C. (2019). Accumulation of Anthocyanins: An Adaptation Strategy of *Mikania micrantha* to Low

Temperature in Winter. *Frontiers in Plant Science*, 10.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01049>

Zhao, X., Wei, Y., Zhang, J., Yang, L., Liu, X., Zhang, H., Shao, W., He, L., Li, Z., Zhang, Y., & Xu, J. (2021). Membrane Lipids' Metabolism and Transcriptional Regulation in Maize Roots Under Cold Stress. *Frontiers in Plant Science*, 12.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.639132>

Zhang, Y.-L., Zhang, C.-L., Wang, G.-L., Wang, Y.-X., Qi, C.-H., You, C.-X., et al. (2019). Apple AP2/EREBP transcription factor MdSHINE2 confers drought resistance by regulating wax biosynthesis. *Planta* 249, 1627–1643. doi:10.1007/s00425-019-03115-4.

Zimmermann, I. M., Heim, M. A., Weisshaar, B., & Uhrig, J. F. (2004). Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *The Plant Journal*, 40(1), 22-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02183.x>



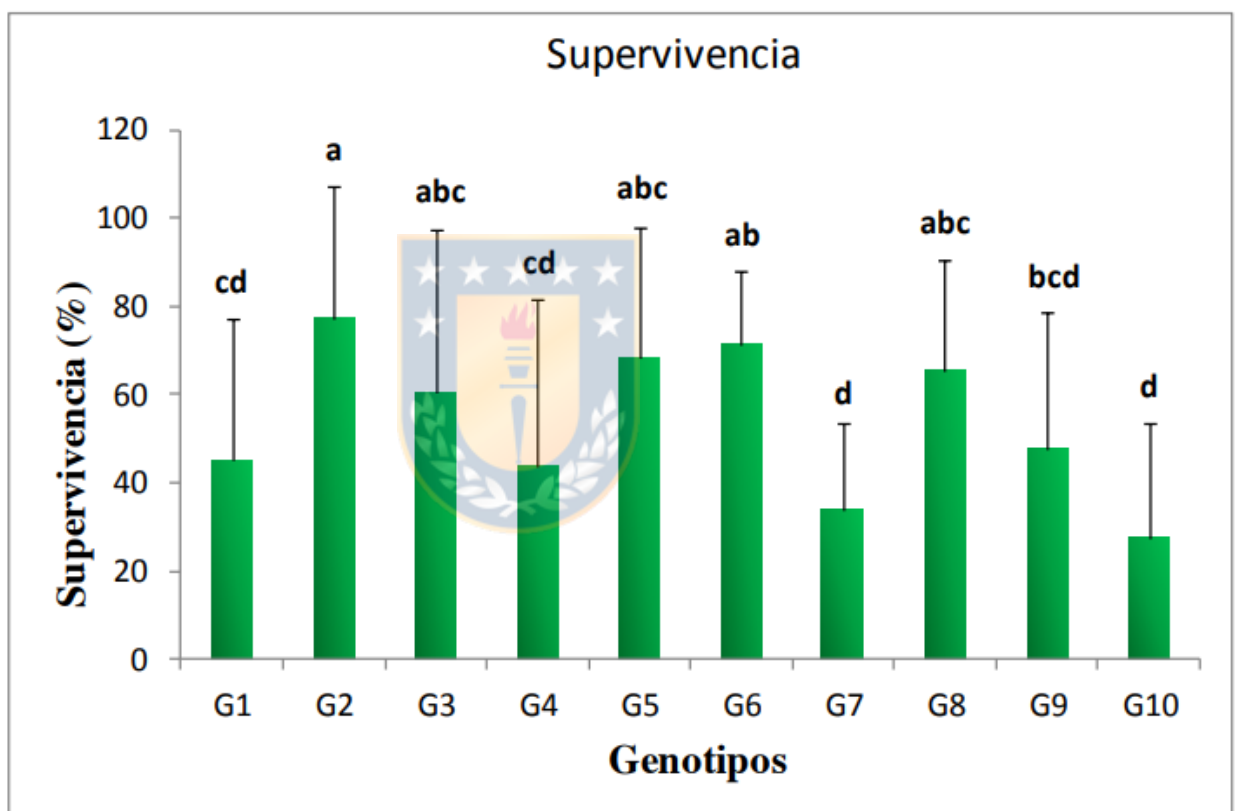
VII. ANEXO

Anexo 1: Valores de LT50 determinados en el ensayo. Especies: G1 (*E. globulus*), G2 (*E. nitens*), G3-G10 (híbridos *E. nitens* x *E. globulus*). Condición: no aclimatado (NA), aclimatado antes de helada (AAH) y aclimatado después de helada (ADH). Extraído de Arias (2016)

Valores de LT₅₀ (°C)

Genotipo	Condición	NA	AAH	ADH
G1		-3,09105246	-4,15026514	-4,12822417
G2		-5,56039692	-6,17110606	-7,62502038
G3		-4,90224072	-5,12203842	-6,40374256
G4		-3,51083356	-3,59258204	-5,24288785
G5		-3,79362525	-5,64351855	-7,253768
G6		-4,02404369	-5,02733813	-8,00475002
G7		-5,85902571	-6,17429415	-7,1337241
G8		-6,41807745	-6,77336485	-6,52655656
G9		-5,77781692	-6,65988468	-9,35176936
G10		-4,88248924	-5,67781043	-6,75352288

Anexo 2: Porcentaje de supervivencia en G1 (*E. globulus*), G2 (*E. nitens*), G3-G10 (híbridos *E. nitens* x *E. globulus*). Letras iguales no difieren estadísticamente p. Extraído de Arias (2016)



Anexo 3: Mapping entre bibliotecas de *E.globulus*, *E. nitens* e híbrido.
 Condición NA: No aclimatado; AAH: Aclimatado antes de helada; ADH:
 Aclimatado después de helada.

Bibliotecas trascriptomas	Porcentaje transcritos anotados (%)			Porcentaje total anotación
	NA	AAH	ADH	
<i>E. globulus</i>	96,6	96,8	96,5	96,6
híbrido	89,6	90	90,5	89,7
<i>E. nitens</i>	50	50,3	53,2	51,2



Anexo 4: Código de dominios funcionales de proteínas reportadas por base de datos Pfam

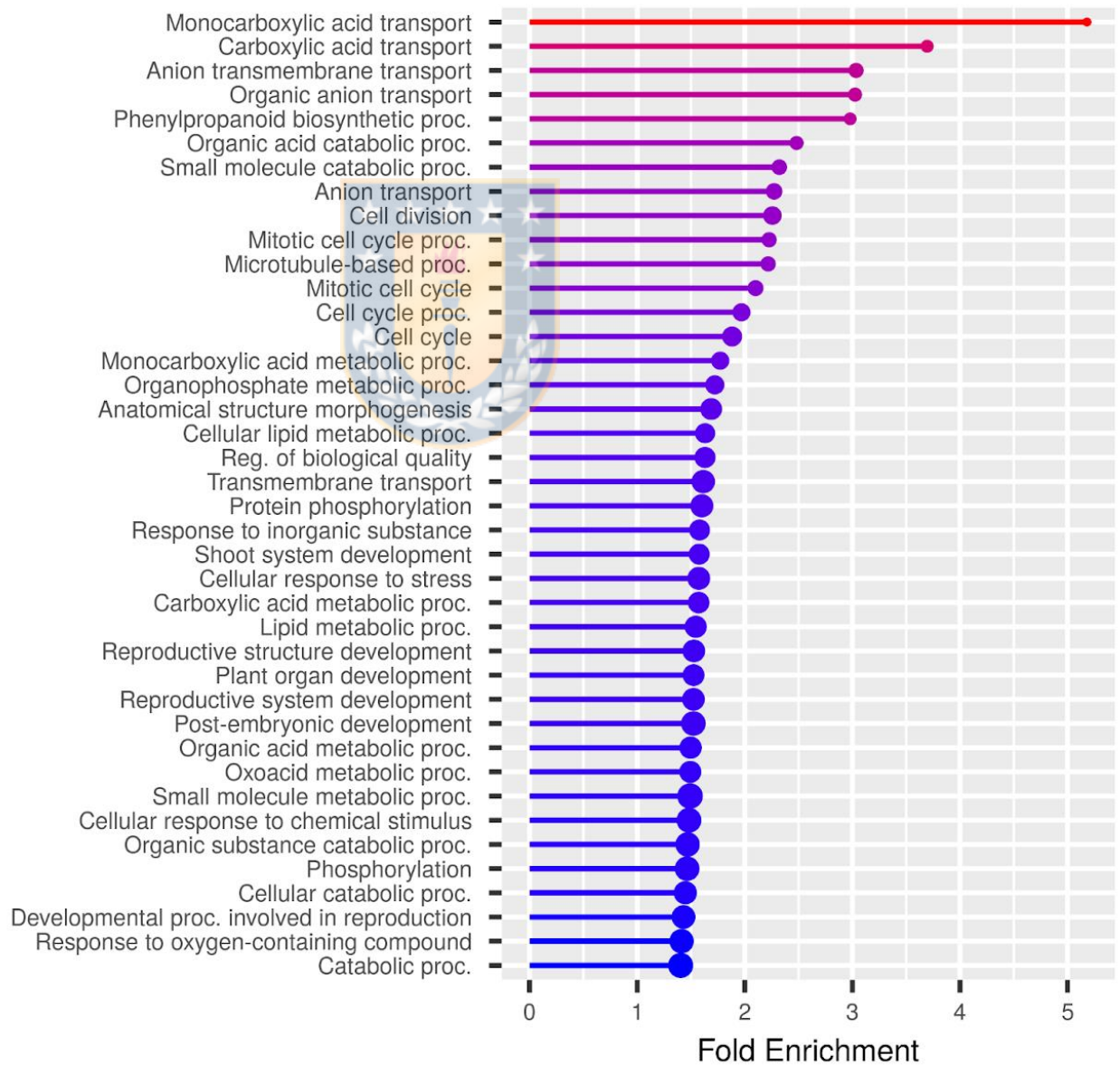
Secuencia Arabidopsis	Pfam	Funcion dominios
at1g02205	PF04116	FA_hydroxylase
at1g02205	PF12076	Wax2_C
at1g15360	PF00847	AP2
at1g22440	PF08240	ADH_N
at1g22440	PF00107	ADH_zinc_N
at4g16210	PF00378	ECH_1
at4g34050	PF01596	Methyltransf_3
at5g41040	PF02458	Transferase
AT5G41315	PF14215	bHLH-MYC_N
AT5G41315	PF00010	HLH
at5g63380	PF00501	AMP-binding
at5g63380	PF13193	AMP-binding_C

Anexo 5: Dominios funcionales de proteínas validadas por qPCR en *E. nitens*, *E. globulus* y el híbrido con sus respectivos homólogos en *Arabidopsis*, función y descripción de dominios y proteínas.

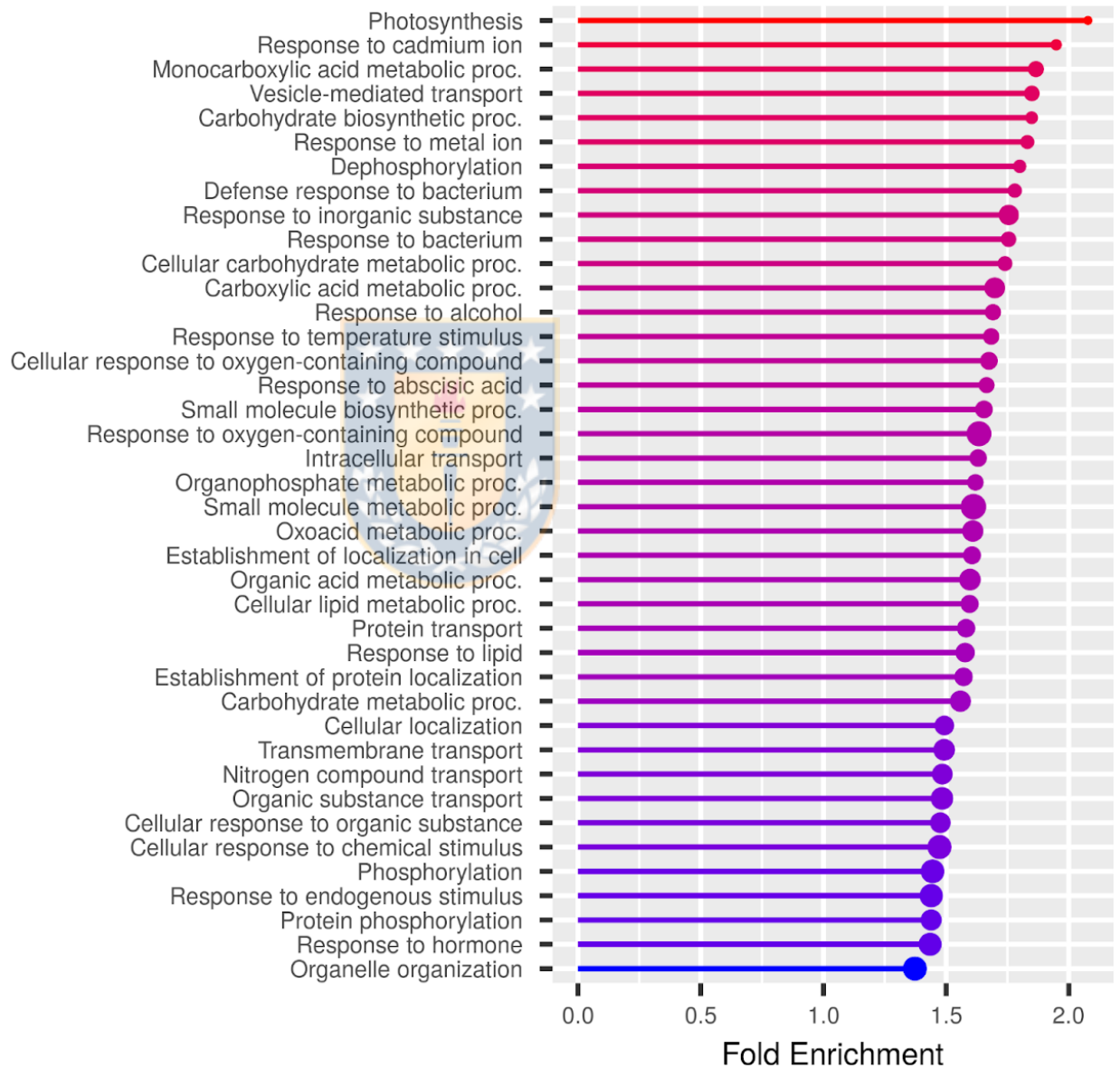
Secuencia <i>Arabidopsis</i>	Función proteína	Pfam	Función dominios	Especie
at1g02205	Hidrolasa de ácidos grasos	PF04116 / PF12076	FA_hydroxylase / Wax2_C	<i>E. globulus</i>
at1g22440	Alcohol deshidrogenasa de unión a Zinc	PF08240 / PF00107	ADH_N / ADH_zinc_N	<i>E. globulus</i>
AT5G41315	bHLH	PF14215 / PF00010	bHLH-MYC_N / HLH	<i>E. globulus</i>
at5g63380	Ligasa y sintetasa dependiente de AMP	PF00501 / PF13193	AMP-binding / AMP-binding_C	<i>E. globulus</i>
*AT5G41315	bHLH	PF14215	bHLH-MYC_N	<i>E. nitens</i>
*at1g02205	Hidrolasa de ácidos grasos	PF12076	Wax2_C	<i>E. nitens</i>
at5g41040	Suberina alifática feruloil-transferasa	PF02458	Transferase	<i>E. nitens</i>
at1g02205	Hidrolasa de ácidos grasos	PF04116 / PF12076	FA_hydroxylase / Wax2_C	híbrido
at1g22440	Alcohol deshidrogenasa de unión a Zinc	PF08240 / PF00107	ADH_N / ADH_zinc_N	híbrido
at4g16210	Enoil-CoA hidratasa/isomerasa	PF00378	ECH_1	híbrido
at4g34050	Caffeoil CoA o-metiltransferasa	PF01596	Methyltransf_3	híbrido
at5g41040	Suberina alifática feruloil-transferasa	PF02458	Transferase	híbrido
at5g63380	Ligasa y sintetasa dependiente de AMP	PF00501 / PF13193	AMP-binding / AMP-binding_C	híbrido

* Las secuencias mostradas no presentan un dominio funcional pero fueron consideradas como proteínas funcionales

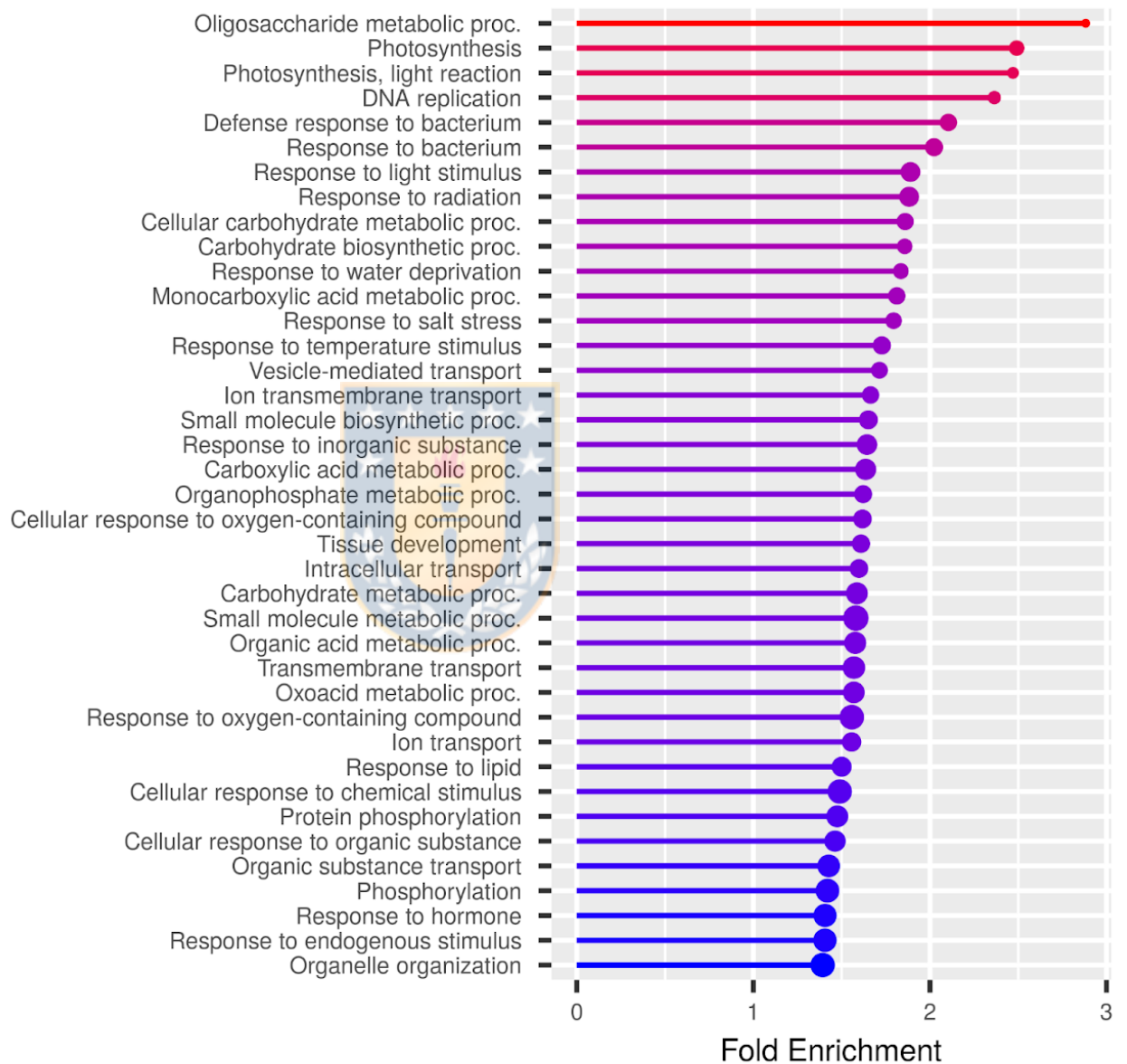
Anexo 6: Representación GO de transcriptoma completo expresado diferencialmente para genotipo híbrido en la condición ADH



Anexo 7: Representación GO de transcriptoma completo expresado diferencialmente para genotipo *E. globulus* en la condición ADH



Anexo 8: Representación GO de transcriptoma completo expresado diferencialmente para genotipo *E. nitens* en la condición ADH



Anexo 9: Heatmap de 188 proteínas expresadas diferencialmente en la condición aclimatado después de helada (ADH) obtenidos por literatura y bases de datos. Se realizó el análisis en los tres genotipos en estudio utilizando el conjunto de datos proveniente de Edger, DESeq2 y NOISeqBIO (para el caso de *E. nitens*).

