



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE CUATRO FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN NAC ASOCIADOS A RESPUESTA ANTE
ACLIMATACIÓN AL FRÍO EN *Eucalyptus globulus*.**

Proyecto de Título presentado a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de
Concepción para optar al título profesional de
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

POR: Daniel Ignacio Chávez Manríquez

Profesor Guía: Sofía Valenzuela Águila

Concepción, Chile 2023

© 2023

Daniel Ignacio Chávez Manríquez

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

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE CUATRO FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NAC ASOCIADOS A RESPUESTA ANTE ACLIMATACIÓN AL FRÍO EN *Eucalyptus globulus*.

Profesor Guía



Sofía Valenzuela Águila
Profesora Titular .
Bioquímica, Dr. Re. Nat.

Profesor Co Guía



Paula Aguayo Cárcamo
Profesor Asociado
Biotecnóloga vegetal, Dr(c).

Calificación del Proyecto de Título:

Sofía Valenzuela Águila: 7,0

Paula Aguayo Cárcamo: 7,0

DEDICATORIA

Dedicado a mis queridas hermanas menores por alegrarme los días cuando llegaba cansado de la U y en especial a mi madre que se sacó la cresta solita por sacarnos adelante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi madre por su incondicional apoyo en todos los momentos de mi vida ya que sin ella no hubiese estudiado y descubierto el amor por la ciencia. Agradecer a mi nana Vale por sus abrazos y apoyo que me da todos los días, a mi nana Lore por su alegría que me contagia todos los días y me ayuda a seguir adelante. A mi familia del norte que a pesar de la distancia me brindan su apoyo cada vez que lo he necesitado, a mi Padre por sus consejos y apoyo incondicional, a mis hermanos Luis y Johan y mi hermana Emilia.

A mi mama Jova y mama Sara por preocuparse de mí cuando era un niño, siempre se encuentran al pendiente mío.

A mis amigos de infancia que nunca hemos perdido contacto y siempre han estado presente en mi vida, a la Concrachi Crew y Fieshta Team.

A mis amigos que conocí en estos 5 años de carrera los cuales me enseñaron mil cosas y no tengo palabras para agradecer. Allan, Mauri, Javier y Nico

A mi profesora guía Sofía Valenzuela, por permitirme ser tesista del laboratorio de Genómica Forestal.

A mi profesora Co-guía, Paula que me brindó su apoyo siempre de la mejor forma y con la mayor disposición posible, gracias por motivarme a participar en un congreso y permitir ser tu ayudante. Agradezco su buena voluntad y simpatía. Gracias por creer en mí.

Finalmente agradecer a la vida por permitirme llegar donde estoy y enseñarme que a pesar de que las cosas parecen imposibles, con esfuerzo y dedicación siempre se puede salir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características de <i>Eucalyptus globulus</i>	1
1.2 Estrés por frío y aclimatación en <i>Eucalyptus globulus</i>	2
1.3 Factores de transcripción y su relación con el estrés por frío.....	3
1.4 Factores de transcripción NAC.....	4
II. METODOLOGÍA.....	7
2.1 Ensayo de aclimatación al frío con helada en <i>Eucalyptus globulus</i>	7
2.1.1 Ensayo de aclimatación	7
2.1.2 Análisis de supervivencia	9
2.2 Identificación del dominio NAC y sus motivos proteicos.....	10
2.2.1 Origen de los genes NAC sujetos a estudio.....	10
2.2.2 Obtención de dominio NAC y motivos proteicos.....	11
2.2.3 Construcción de árbol filogenético.....	11
2.3 Extracción de ARN y síntesis de cDNA.....	11
2.4 Análisis de expresión relativa mediante qRT-PCR.....	12
2.4.1 Diseño de partidores para qRT-PCR.....	12
2.4.2 q-PCR.....	12
III. RESULTADOS.....	14
3.1 Análisis de supervivencia.....	14
3.2 Búsqueda de dominios.....	15
3.3 Motivos proteicos.....	15
3.4 Árbol filogenético.....	16
3.5 Análisis de expresión relativa.....	19
3.5.1 Análisis de expresión relativa del gen NAC18 de <i>E. globulus</i> (EgloNAC18).....	19
3.5.2 Análisis de expresión relativa del gen NAC35 de <i>E. globulus</i> (EgloNAC35).....	20

3.5.3 Análisis de expresión relativa del gen NAC36 de <i>E. globulus</i> (EgloNAC36).	22
3.5.4 Análisis de expresión relativa del gen NAC47 de <i>E. globulus</i> (EgloNAC47).	23
IV. DISCUSIÓN	25
V. CONCLUSIONES.	30
VI. BIBLIOGRAFÍA	31
VI. ANEXO.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores diseñados en Primer3 para qRT-PCR.	12
Tabla 2. Partidores de genes <i>housekeeping</i> para qRT-PCR.	13
Tabla 3. Información del dominio presente en genes <i>NAC</i> de <i>Eucalyptus globulus</i> relacionados con la aclimatación al frío.	15
Tabla 4. Motivos conservados en cuatro proteínas <i>NAC</i> de <i>Eucalyptus globulus</i>	16
Tabla 5. Porcentajes de identidad de genes ortólogos utilizados en Árbol filogenético. .	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Temperaturas en grados Celsius de día (Verde) y noche (Azul) a través del tiempo durante ensayo de aclimatación con helada en cámaras de cultivo.	7
Figura 2: Establecimiento de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> juveniles en cámara de cultivo, A) plantas en condición NA: No Aclimatada, B) plantas en condición AAH: Aclimatado Antes de la Helada y C) plantas en condición ADH: Aclimatado Después de la Helada.	9
Figura 3: Heatmap de 14 genes <i>NAC</i> de <i>Eucalyptus globulus</i> en hoja bajo tratamiento de aclimatación al frío. NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado Antes de Helada y ADH: Aclimatado Después de Helada.	10
Figura 4: Supervivencia porcentual después de tratamiento con bajas de temperaturas, letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (Test de Leven, $p \leq 0.05$). T1: Tolerante 1, T2: Tolerante 2, S1: Susceptible 1 y S2: Susceptible 2.	14
Figura 5: Árbol filogenético de Factores de transcripción <i>NAC</i> en <i>Eucalyptus globulus</i> (Círculo verde), <i>Eucalyptus grandis</i> (Diamante azul) y <i>Arabidopsis thaliana</i> (Cuadrado rojo). Secuencias completas de las proteínas <i>NAC</i> fueron alineadas usando ClustalW y la construcción del árbol fue mediante el método Neighbor-Joining en el software MEGA 11. El valor <i>bootstrap</i> fue de 1000 repeticiones.	18

- Figura 6: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC18* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando α -*tubulina* y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).20
- Figura 7: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC35* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando α -*tubulina* y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).21
- Figura 8: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC36* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando α -*tubulina* y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).22
- Figura 9: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC47* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando α -*tubulina* y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).24

RESUMEN

Eucalyptus globulus es una especie arbórea originaria de Australia, es cultivada en gran parte del mundo debido a su rápido crecimiento y alta calidad de pulpa. Las heladas repentinas (-5°C) provocan daños severos en el follaje y parte del tallo en el primer año de cultivo de esta especie.

El proceso de aclimatación al frío es la manera en la cual las plantas adquieren tolerancia a la congelación tras una exposición previa a temperaturas bajas. La aclimatación y el estudio de las distintas funciones de los procesos moleculares otorga un mejor entendimiento en *Eucalyptus spp.* cuando se ve afectado a estrés por frío.

Los factores de transcripción desempeñan funciones esenciales en múltiples respuestas de estrés abiótico, a través de la unión a elementos en *cis* encontrados río arriba ajustando la expresión génica.

La familia NAC es una de las familias de FT más grandes en plantas y juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de estas, al verse involucrados en la respuesta a distintos tipos de estreses abióticos promoviendo su tolerancia.

Mediante la identificación de dominios y motivos proteicos, se realizó un árbol filogenético en el cual se relacionan genes de la familia NAC de *E. globulus*, *E. grandis* y *A. thaliana*. Finalmente se realizó un análisis de expresión relativa mediante qRT-PCR de los genes *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* y *NAC47* tras un proceso de aclimatación a frío en cuatro genotipos contrastantes de *E. globulus*.

En el marco de aclimatación tras el tratamiento realizado, el gen *EgloNAC18* presentó una disminución en la abundancia de transcrito, *EgloNAC35* presentó un considerable aumento en su abundancia de transcrito, *EgloNAC36* presentó un aumento en la abundancia de transcrito en genotipos tolerantes y una disminución en genotipos susceptibles. Finalmente, *EgloNAC47* presentó una disminución en el transcrito. Demostrando la participación de estos cuatro genes *NAC* en procesos de aclimatación ante bajas temperaturas.

ABSTRACT

Eucalyptus globulus is a native species from Australia, it is cultivated in much of the world as it is considered fast growing. In addition, it has high quality pulp. Sudden frosts (-5°C) cause severe damage to the foliage and part of the stem in the first year of cultivation of this species.

The cold acclimatization process is the way in which plants acquire frost tolerance after previous exposure to low temperatures. The acclimatization and the study of the different functions of the molecular processes gives a better understanding in *Eucalyptus* spp. when affected by cold stress.

Transcription factors play essential roles in multiple abiotic stress responses, through binding to upstream cis-elements adjusting gene expression.

The NAC family is one of the largest TF families in plants and they play a fundamental role in their growth and development, being involved in the response to different types of abiotic stresses, promoting their tolerance.

Through the identification of protein domains and motifs, a phylogenetic tree was made in which genes of the NAC family of *E. globulus*, *E. grandis* and *A. thaliana* are related. Finally, a relative expression analysis was performed by qRT-PCR of the *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* and *NAC47* genes after a cold acclimatization process in four contrasting *E. globulus* genotypes.

In the acclimatization framework after the treatment performed, the *EgloNAC18* gene presented a decrease in transcript abundance, *EgloNAC35* presented a considerable increase in its transcript abundance, *EgloNAC36* presented an increase in transcript abundance in tolerant genotypes and a decrease in genotypes. susceptible. Finally, *EgloNAC47* presented a decrease in the transcript. Demonstrating the participation of these four *NAC* genes in acclimatization processes to low temperatures.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los pilares de la economía chilena es la industria forestal, que se basa en la producción de pulpa y productos madereros que son exportados a diferentes países del mundo, siendo parte del 2,0% del PIB en el año 2020 y colocando a Chile dentro de los primeros 10 países líderes en exportación (INFOR 2021).

Principalmente son tres las especies forestales cultivadas actualmente en Chile, *Pinus radiata*, *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*. Siendo *E.globulus* la segunda especie mayormente cultivada en el área forestal, abarcando 580.726 ha. ocupando más de un 30% del área cultivada de la región del Bio-bio (INFOR 2021). Su rendimiento anual promedio llega a 25 m³/ha y posee una densidad aproximada de 400-610 kg/m³ características que superan en producción final de celulosa por hectárea a la principal especie forestal, *P. radiata* (INFOR 2003).

1.1 Características de *Eucalyptus globulus*.

Eucalyptus globulus es una especie arbórea originaria de Australia, pertenece a la familia *Myrtaceae*, subclase *Rosidae*, división *Magnoliophyta* (Kirkpatrick 1974). Es cultivada en gran parte del mundo ya que posee una rotación de cultivo de entre 10 a 18 años para la producción de pulpa por lo que es considerado de rápido crecimiento. Además, su alta calidad de pulpa lo hace idóneo para la industria papelera (Chantal *et al.* 2007, Ruíz *et al.* 2008).

La temperatura favorable para su óptimo desarrollo y crecimiento oscila entre los 10° a 15° C, soportando temperaturas máximas de 40.5° C y mínimas de -4.5° C por breves periodos de tiempo (Brinkmann 1992). Para su óptimo desarrollo se estipulan precipitaciones entre 600 y 2500 mm, con una humedad relativa de entre 73 y 81% (Acevedo 2008). Cuando la planta de *E. globulus* se ve afectada por bajas temperaturas puede causar reducción en niveles fotosintéticos, disminución del potencial hídrico, baja absorción de nutrientes, daño en las membranas celulares, deshidratación celular, muerte

de tejidos, disminución de la expansión foliar, marchitamiento, clorosis e incluso necrosis, limitando su productividad y ubicación geográfica para su cultivo (Aguayo *et al.* 2019).

1.2 Estrés por frío y aclimatación en *Eucalyptus globulus*.

El estrés por frío o enfriamiento es considerado de 10-0°C y la congelación por bajas temperaturas comienza a partir de los 0°C, estas temperaturas deterioran significativamente la integridad de la membrana celular provocando la inhibición de la fotosíntesis, que eventualmente termina afectando el crecimiento y desarrollo de las plantas incluso en condiciones óptimas de luz (Dong *et al.* 2022). Las heladas repentinas (-5°C) provocan daños severos en el follaje y parte del tallo en el primer año de cultivo de *E. globulus*, provocando una reducción de hasta un 57% en su tasa de crecimiento en comparación con plantas no afectadas por este evento climático (Bamelli *et al.* 2007). Se ha determinado que plantas juveniles son menos tolerantes al estrés por frío que los individuos adultos y que ha temperaturas menores que -5°C pueden sufrir daño severo que guiará a una muerte temprana de la planta (Aguayo *et al.* 2022). El daño debe evaluarse de 2 meses a 6 meses luego de producido ese evento meteorológico, ya que puede existir pérdida del ápice o de toda la copa en los meses siguientes (Broschat 2013, Crane 2010). Cuando la severidad del daño foliar es considerable su sobrevivencia se ve comprometida afectando la productividad del *E. globulus* ya que esta depende principalmente de la cantidad de individuos por hectárea que sobreviven hasta la edad de cosecha (Balmelli y Resquin 2005).

El proceso de aclimatación al frío es la manera en la cual las plantas adquieren tolerancia a la congelación tras una exposición previa a temperaturas bajas que no alcanzan temperaturas de congelación (< 0°C)(Keller *et al.* 2013). Este proceso previene a la planta de la formación de hielo extracelular que causa deshidratación celular debido a la pérdida de agua por el crecimiento de este en sus tejidos vegetativos, mejorando su tolerancia al estrés por frío (Chinnusamy *et al.* 2007, Pearce 2001). Estudios moleculares

han demostrado que la aclimatación al frío en las plantas es un proceso complejo e involucra a diferentes vías de regulación, las cuales pueden ser vías metabólicas independientes o interactuantes dificultando su estudio (Fernandez *et al.* 2006).

La aclimatación y el estudio de las distintas funciones de los procesos moleculares otorga un mejor entendimiento de *Eucalyptus spp.* cuando se ve expuesto a condiciones de estrés por frío, ya que permite identificar genes asociados a la respuesta y tolerancia a este tipo de estrés, que son la base de las respuestas bioquímicas y fisiológicas que genera la planta para defenderse del ambiente (Keller *et al.* 2013).

1.3 Factores de transcripción y su relación con el estrés por frío.

Muchas familias de factores de transcripción (FT) tales como MYB, bZIP, DREB, NAC, bHLH etc., están emergiendo como FT reguladores centrales de las respuestas al estrés, por lo tanto, son herramientas biotecnológicas ideales para el desarrollo de cultivos vegetales tolerantes a distintos tipos de estrés (Srivastava *et al.* 2022).

Utilizando las avanzadas herramientas moleculares, técnicas y métodos de secuenciación de alto rendimiento se puede caracterizar e identificar diferentes genes de respuesta a estrés abiótico. Gracias a la caracterización basada en la secuencia de los genes de estrés existen dos categorías: la primera es el gen funcional y la segunda es el gen regulador. El gen funcional consiste principalmente en enzimas y proteínas metabólicas que protegen a la célula del daño, mientras que el segundo genera proteínas reguladoras o factores de transcripción (FT) que regulan la transducción de señales y la expresión génica en las respuestas al estrés (Shinozaki *et al.* 2003, Warsi *et al.* 2022).

Se ha evidenciado que un único gen funcional no es suficiente para mantener la integridad de la planta en condiciones de estrés, porque cada estrés en particular induce a múltiples genes en su respuesta (Mittler y Blumwald 2010). Los genes reguladores, incluidos los FT, desempeñan funciones esenciales en múltiples respuestas de estrés

abiótico, a través de la unión a elementos en *cis* encontrados río arriba, ajustan la expresión génica al momento de unirse a estos elementos ubicados en la región promotora de diferentes genes relacionados con el estrés actuando como interruptores moleculares para la expresión (Joshi *et al.* 2016, Shao *et al.* 2015). Identificar los genes reguladores responsables de la respuesta de la planta al estrés es el paso base para generar cultivos altamente resistentes y con mayor tolerancias. Además, los FT son la llave regulatoria de los mecanismos sensibles de estrés abiótico, convirtiéndolos en candidatos idóneos para el mejoramiento de la tolerancia al estrés en plantas (Baillo *et al.* 2019, Kimotho *et al.* 2019, Wang *et al.* 2016).

1.4 Factores de transcripción NAC

La familia de FTs NAC es una de las familias de genes más grandes en plantas y se caracteriza por la presencia de dominios de unión de ADN altamente conservados denominados NAC. Este acrónimo “NAC” deriva de las 3 primeras proteínas caracterizadas con un dominio en particular (dominio NAC), “NAM” (sin meristema apical) proveniente de petunia, “Arabidopsis ATAF1/2” y “CUC2” (cotiledón en forma de copa) (Souer *et al.* 1996, Aida *et al.* 1997). El dominio NAC presenta una región N-terminal proteica que contiene aproximadamente 160 aminoácidos residuales que se encuentra dividido en 5 subdominios (A-B-C-D-E), los cuales poseen funciones asociadas a la unión al ADN, localización nuclear y formación de dímeros con otras proteínas pertenecientes a la familia NAC (Ooka *et al.* 2003, Shao *et al.* 2015). Esta familia de FT posee una región C-terminal altamente divergente y contiene regiones que pueden activar o reprimir la transcripción (Duval *et al.* 2002, Rui *et al.* 2023). Los miembros correspondientes a esta familia juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de la planta, ya que se ven involucrados en la respuesta a distintos tipos de estreses abióticos promoviendo su tolerancia (Yuan *et al.* 2022).

El número de FTs NAC presentes en el genoma varía dependiendo de la especie, se han evidenciado desde 71 NACs en Garbanzo (*Cicer arietinum L.*) hasta 204 en Nabo

(*Brassica rapa*) por lo que no se puede generalizar su frecuencia, pero si en sus funciones, las cuales destacan tolerancias a sequías, alta salinidad y bajas temperaturas o frío (Shao *et al.* 2015).

En arroz (*Oryza sativa*) el gen *OsNAC6* es expresado en respuesta a condiciones de estrés abiótico, tal como estrés por frío, estrés hídrico y estrés salino severo (Nakashima *et al.* 2007). En Tomate (*Solanum lycopersicum*) se han identificado 104 genes *NAC* (*SINAC*) con múltiples funciones en la regulación de rutas de señales relacionadas al estrés abiótico, respondiendo a señales de bajas temperaturas (4°C), sequías (15 % PEG 6,000) y alta salinidad (250 mM NaCl) (Su *et al.* 2015). En algodón (*Gossypium hirsutum*) el FT *GhNAC072* transformado en *Arabidopsis thaliana* demostró un potencial rol en la tolerancia a estrés hídrico y salino junto con cambios a nivel morfofisiológicos significativos, tales como altos contenidos de agua relativa en las hojas, mayor contenido de clorofila y altos niveles de germinación en comparación con plantas no transformadas. También, se evidenciaron en líneas sobre expresadas una mayor cantidad de antioxidantes durante el periodo de exposición de estrés (Mehari *et al.* 2022).

En *Eucalyptus grandis* se han identificado 189 dominios NAC que codifican de 82 a 799 proteínas residuales, entre los cuales se mencionan su relación en la lista de genes regulados mediante el estrés por frío. En *Eucalyptus globulus* se ha demostrado la participación de FTs NAC en la regulación transcripcional positiva y negativa durante periodos de estrés por bajas temperaturas (7°C) en tratamientos aclimatados, demostrando expresiones transcripcionales significativas en respuesta al estrés por frío sobre tejidos foliares, tallos primarios, tallos secundarios y raíces (Hussey *et al.* 2015).

Con esta información planteada respecto a *Eucalyptus globulus* y sus pérdidas económicas debido a heladas primaverales que afectan plantaciones juveniles, junto con

la importancia de la familia de FT NAC como posibles reguladores de la expresión génica relacionados a la tolerancia al frío se plantea lo siguiente:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existirán diferencias significativas en los niveles de expresión de cuatro genes NAC de *Eucalyptus globulus* tras proceso de aclimatación al frío con bajas temperaturas y fotoperiodo controlado al momento de sufrir una helada primaveral simulada?

HIPÓTESIS:

Se encontrará el dominio asociado a la familia NAC y los niveles de expresión génica de *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* y *NAC47* se diferenciarán significativamente entre distintos tratamientos en *Eucalyptus globulus* tras proceso de aclimatación al frío con temperaturas y fotoperiodo controlado.

OBJETIVO GENERAL:

Examinar el dominio conservado presente de los genes *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* y *NAC47* y analizar sus niveles de expresión relativa en material vegetal foliar de genotipos contrastantes de *Eucalyptus globulus* tras proceso de aclimatación al frío.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar dominios presentes en las secuencias proteicas de los cuatro genes NAC y construir árbol filogenético con las especies *Eucalyptus grandis* y *Arabidopsis thaliana*.
2. Determinar porcentaje de supervivencia en distintos genotipos de *Eucalyptus globulus* sometidos a proceso de aclimatación al frío durante ensayo en cámaras de crecimiento con bajas temperaturas y fotoperiodo controlado.
3. Analizar los niveles de expresión relativa de los cuatro genes NAC en tejido foliar de cuatro genotipos diferentes de *Eucalyptus globulus* tras proceso de aclimatación al frío.

II. METODOLOGÍA

2.1 Ensayo de aclimatación al frío con helada en *Eucalyptus globulus*

2.1.1 Ensayo de aclimatación

El ensayo de aclimatación fue realizado en los meses de mayo y junio del año 2022 con el fin de obtener muestras foliares de la especie para su posterior análisis de expresión relativa. Se dispusieron cuatro diferentes genotipos de *E. globulus* con 81 individuos por genotipo respectivamente y se les realizó un conteo de yemas laterales, apicales y hojas para futuro análisis de supervivencia, el material vegetal utilizado fue suministrado por Bioforest S.A., una empresa chilena de investigación forestal. Con el fin de someter las plantas a un tratamiento de bajas temperaturas simulando una helada primaveral, todo el proceso fue realizado en cámaras de cultivo con temperatura y fotoperiodo controlado (Figura 1). Al comienzo del ensayo se fertilizaron los individuos con macronutrientes NPK y durante los siguientes 30 días, periódicamente se suministró agua día por medio con un aspersor a cada planta para evitar el estrés hídrico.

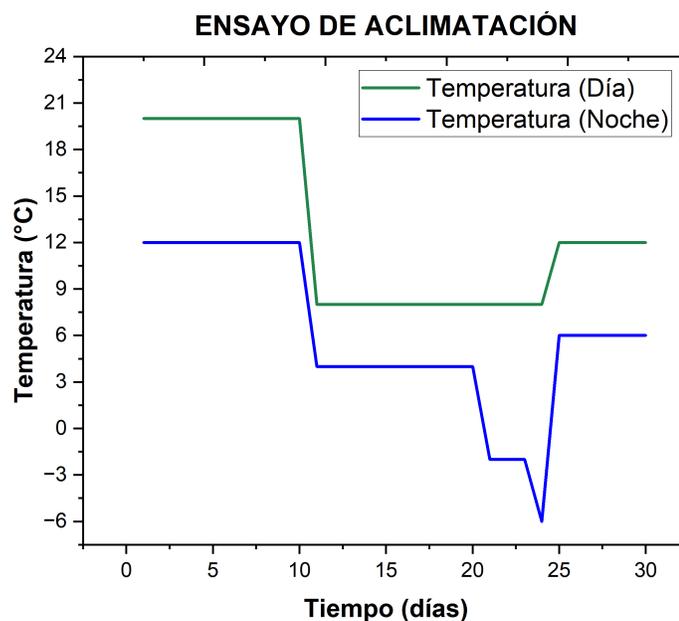


Figura 1: Temperaturas en grados Celsius de día (Verde) y noche (Azul) a través del tiempo durante ensayo de aclimatación con helada en cámaras de cultivo.

Durante los primeros diez días las plantas de *E. globulus* juveniles de aproximadamente 1 año y 30cm de altura, se mantuvieron a una temperatura constante de 20 °C día y de 12°C noche con un fotoperiodo de 14 horas luz (Figura 1). En esta condición control con temperaturas ideales para el crecimiento de *E.globulus* se seleccionaron cinco individuos (rametos) de forma azarosa por genotipo para el muestreo de hojas, a esta condición se le denominó No Aclimatada (NA) (Figura 2A). En el día once del tratamiento, se realizó un proceso de aclimatación al frío en el cual las plantas de todos los genotipos fueron sometidas durante dos semanas a una temperatura constante de 8°C día y de 4°C noche (Figura 2B), con un fotoperiodo de diez horas luz, al terminar la primera semana con estas condiciones de bajas temperaturas se seleccionaron nuevamente cinco rametos por genotipo de forma azarosa para el muestreo de hojas, a esta condición se le denominó Aclimatada Antes de Helada (AAH). Posteriormente, hubo dos noches en la cuáles se bajó la temperatura a -2°C, la noche siguiente se produjo una helada controlada sometiendo a las plantas a -6°C. En la mañana del día 25 se realizó la última selección de cinco rametos azarosos que fueron denominados como condición Aclimatada Después de la Helada (ADH) (Figura 2C). Al momento de finalizar el muestreo de todas las condiciones mencionadas se reguló la temperatura a 12°C durante el día y 6°C por la noche junto con un fotoperiodo de 14 horas luz por los últimos 5 días del tratamiento para el análisis de supervivencia. Finalmente se hizo un recuento de individuos vivos o muertos junto con un recuento de yemas laterales, apicales y hojas para poder determinar la supervivencia de cada genotipo e identificar genotipos tolerantes o susceptibles.

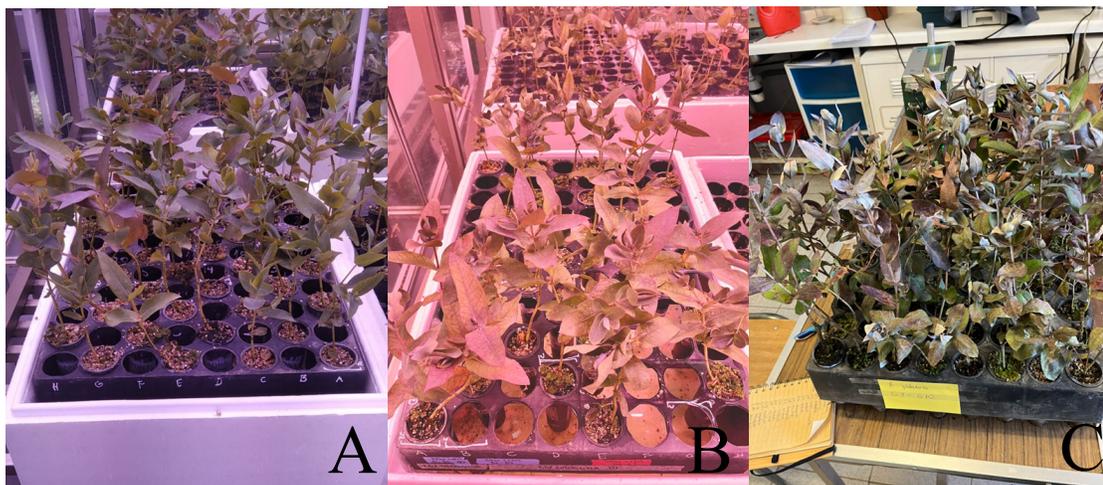


Figura 2: Establecimiento de plantas de *Eucalyptus globulus* juveniles en cámara de cultivo, A) plantas en condición NA: No Acclimatada, B) plantas en condición AAH: Acclimatado Antes de la Helada y C) plantas en condición ADH: Acclimatado Después de la Helada.

2.1.2 Análisis de supervivencia

Al comienzo del ensayo de aclimatación se realizó un análisis de supervivencia, para el cual se contabilizó el número total de hojas, yemas axilares y ápices vivos de cada uno de los rametos pertenecientes a su respectivo genotipo. Luego de transcurrido los 30 días del ensayo a temperaturas y fotoperiodos controlados, nuevamente se contabilizó de forma visual el número total de hojas, yemas y ápices vivos o muertos de los rametos restantes del ensayo. Al finalizar la toma de datos, se realizó mediante el software R un análisis estadístico ANOVA. Una vez obtenidos estos resultados, al test ANOVA se le aplicó una prueba de Duncan en la cual se consideró como significativo un valor $p \leq 0.05$.

2.2 Identificación del dominio NAC y sus motivos proteicos.

2.2.1 Origen de los genes NAC sujetos a estudio.

En primer lugar, el grupo de laboratorio de genómica forestal realizó una librería RNA-seq para *Eucalyptus globulus* de la cual se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los genes putativos *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* y *NAC47* (Aguayo *et al.* 2019). Luego el mismo equipo de trabajo realizó un análisis *differentially expressed genes* (DEG) de 103 genes identificados en muestras sometidas a estrés por frío (Datos no publicados), de los cuales se seleccionaron genes que demostraron diferencias significativas en su expresión ante el tratamiento descrito en la Figura 1, 14 genes putativos *NAC* mostraron diferencias significativas, los cuales fueron representados en un Heatmap (Figura 3). Debido a este resultado se escogieron los cuatro genes anteriormente mencionados, ya que mostraron resultados interesantes respecto a sus niveles de expresión, demostrando un alza de expresión en los genes *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* y una baja de expresión el gen *NAC47*.

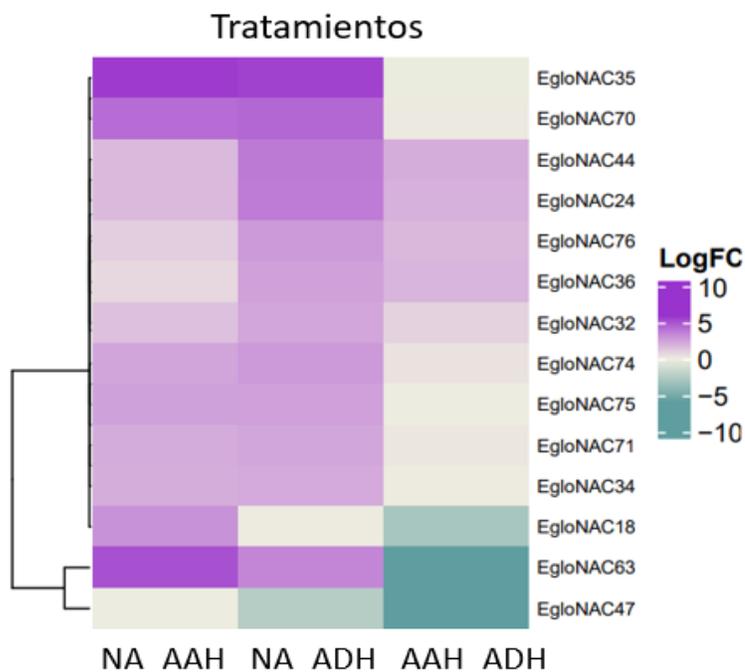


Figura 3: Heatmap de 14 genes *NAC* de *Eucalyptus globulus* en hoja bajo tratamiento de aclimatación al frío. NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado Antes de Helada y ADH: Aclimatado Después de Helada.

2.2.2 Obtención de dominio NAC y motivos proteicos.

Para la obtención de dominios se utilizó la base de datos Pfam (link: <https://pfam-legacy.xfam.org>) y se confirmó el resultado con Prosite (link: <https://prosite.expasy.org>). Luego para la obtención del correcto marco de lectura se utilizó la página NCBI ORFfinder (link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Finalmente, mediante el programa MEME (link: <https://meme-suite.org>) se identificó los motivos conservados, se ajustó el tamaño óptimo del motivo entre 10-100 y un número máximo de motivos a identificar de 15 para las secuencias proteicas.

2.2.3 Construcción de árbol filogenético.

El análisis de secuencias proteicas homólogas se realizó mediante la página NCBI en la cual se realizó un Blast de proteínas para obtener las secuencias con mayor nivel de identidad. Para la construcción del árbol filogenético, se realizó una alineación múltiple de proteínas usando ClustalW (link: <http://www.clustal.org>) con parámetros predeterminados la cual fue mediada por el software MEGA 11, el árbol filogenético se construyó usando el método Neighbor-Joining con un *bootstrap* de 1000 repeticiones en el mismo software.

2.3 Extracción de ARN y síntesis de cDNA.

El material vegetal usado para la extracción de ARN fue tejido foliar recolectado del ensayo de aclimatación descrito anteriormente (Figura 1), Se realizó la extracción a cuatro distintos genotipos con tres rametos por condición respectivamente. La extracción de ARN fue aislada como se describe por Chang et al. (1993) con modificaciones para *E. globulus*, la pureza se midió usando el equipo Nanodrop ND 1000 en rangos de longitud de onda de 230/280 y 260/280, su integridad fue corroborada por un gel de agarosa al 1% (p/v) y observado bajo luz ultravioleta en el equipo trans-iluminador SmartView Pro 1100. También, fue cuantificado mediante el equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc, EE. UU.). El ADNc fue sintetizado utilizando el kit comercial

High Capacity kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4 Análisis de expresión relativa mediante qRT-PCR.

2.4.1 Diseño de partidores para qRT-PCR.

La construcción de los partidores para qRT-PCR fue diseñada siguiendo los parámetros estándar para esta técnica y llevada a cabo por la plataforma Primer3 (link: <https://primer3.ut.ee/>). Se diseñaron pares de partidores para los genes *NAC18*, *NAC35*, *NAC36* y *NAC47* los cuales se encuentran descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores diseñados en Primer3 para qRT-PCR.

Partidor	Secuencia	5'	—————▶	3'
EgloNAC18-F	CAAGCAAGTCGTGAGATTAC			
EgloNAC18-R	AAGGTTGGATGGTATGAGC			
EgloNAC35-F	CAGCAGCAGCAGCAGCAG			
EgloNAC35-R	GTCGTTACCGCCGTAGTTCAC			
EgloNAC36-F	GTGTTGTGTCGGGTGTTCTTC			
EgloNAC36-R	AGTGCCTCTGTTGTCGTAGC			
EgloNAC47-F	GGAAGGCAGATAACCAAG			
EgloNAC47-R	TAGATAACTCGGCAATAACC			

2.4.2 q-PCR.

Para los análisis de expresión relativa q-PCR se utilizó el fluorómetro Evagreen, a un volumen total de reacción de 20 μ L, con los siguientes parámetros: ciclos de 10 min a 95 $^{\circ}$ C en el paso de desnaturalización, posteriormente 40 ciclos de 15s a 95 $^{\circ}$ C y finalmente 1 min a 60 $^{\circ}$ C en el paso de curva de fusión (*curve melting*). Los genes *housekeeping* utilizados para la comparación de niveles de expresión fueron *α -tubulina* y *UBC*, sus

secuencias se encuentran disponible en la tabla 2. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001). Para comparar la expresión de genes entre tratamiento por genotipo se realizó un ANOVA y test de Tukey mediante el software R studio.

Tabla 2. Partidores de genes *housekeeping* para qRT-PCR.

Nombre	Secuencia 5' \longrightarrow 3'
UBC-F	GACGGACAGGAACAAGTATGAGAC
UBC-R	CCCTCCACGGAATTAATGATCGC
α -Tubulina-F	GGAAGATGCTGCCAACAAC TTTGC
α -Tubulina-R	AACCAGTGCCTCCACCAACAG

III. RESULTADOS

3.1 Análisis de supervivencia.

Al finalizar el ensayo de aclimatación al frío se obtuvieron los porcentajes de supervivencia de cada genotipo evaluado. Se determinó mediante test de Levene diferencias significativas entre dos grupos. De esta manera se diferenciaron genotipos tolerantes con porcentajes mayores a 80% (T1 y T2) y genotipos susceptibles con porcentajes menores al 25% de supervivencia (S1 y S2) los cuales se ven representados en la Figura 4.

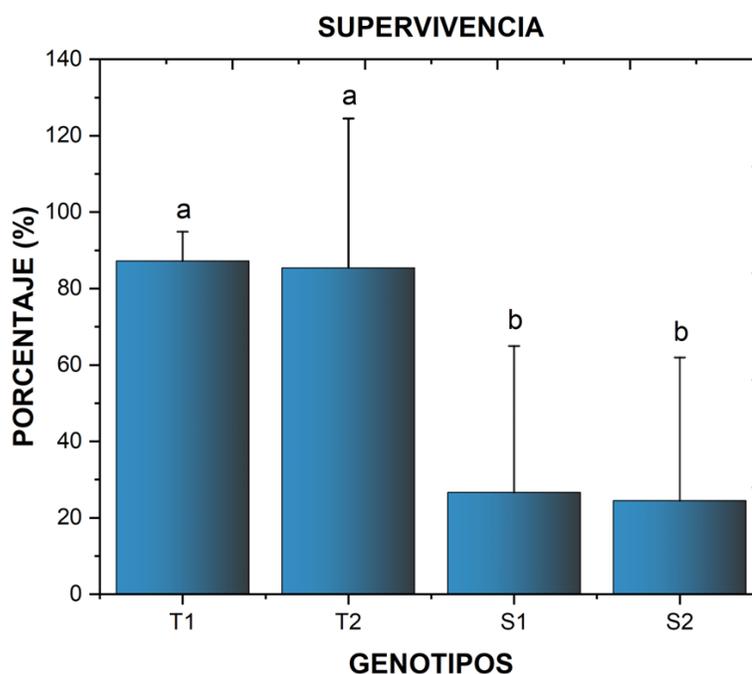


Figura 4: Supervivencia porcentual después de tratamiento con bajas de temperaturas, letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (Test de Leven, $p \leq 0.05$). T1: Tolerante 1, T2: Tolerante 2, S1: Susceptible 1 y S2: Susceptible 2.

3.2. Búsqueda de dominios.

Resultados obtenidos de la página Prosite (link: <https://prosite.expasy.org>) para la obtención del dominio conservado presente en cada gen representado en la Tabla 3, proporciona información respecto al tamaño de la proteína en aminoácidos, el inicio y término del dominio. Se verifica que los 4 genes de estudio pertenecen a la familia NAC ya que cada uno de ellos posee el dominio conservado NAM (No Apical Meristem) presente en su secuencia.

Tabla 3. Información del dominio presente en genes *NAC* de *Eucalyptus globulus* relacionados con la aclimatación al frío.

Gen	Tamaño (aminoácidos)	Inicio y Fin	Dominio
EgloNAC18	255	5 – 154	NAM
EgloNAC35	352	14 - 162	NAM
EgloNAC36	334	43 – 193	NAM
EgloNAC47	444	51 – 196	NAM

3.3 Motivos proteicos.

En la Tabla 4 se muestran los motivos proteicos presentes en las proteínas de los genes *EgloNAC18*, *EgloNAC35*, *EgloNAC36* y *EgloNAC47* obtenidos de la plataforma MEME (link: <https://meme-suite.org>) mediante alineamientos de motivos en la cual se pueden apreciar 15 diferentes motivos con variaciones en la amplitud o tamaño de la secuencia proteica.

Tabla 4. Motivos conservados en cuatro proteínas *NAC* de *Eucalyptus globulus*.

Motivo	Amplitud	Secuencia del Motivo
1	28	VGIKKS LVFYKGRAPKGTKTDWIMHEYR
2	30	EWYFFSPRDRKY PNGARPNRAAASGYWKAT
3	19	LPPGFRFHPTDEELJVHYL
4	9	WVLCRIYKK
5	21	EIDLYKFDPWZLPEKAKLGEK
6	6	VEDPHG
7	20	NZEPSNPVRTNPPAPAVGAM
8	13	WWFICPQANSQRI
9	11	VAGCEESFCII
10	6	EVCDRK
11	6	IPQFRC
12	6	SFDWAH
13	7	CRSMDCE
14	6	KMNRLD
15	7	RPCPMNI

3.4 Árbol filogenético.

El árbol filogenético presente en la Figura 5 fue diseñado mediante el método Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000, representa a los cuatro genes sujeto a estudio de la especie *E. globulus*: *EgloNAC18*, *EgloNAC35*, *EgloNAC36* y *EgloNAC47* junto con sus ortólogos putativos presentes en las especies *E. grandis*, debido a que pertenece al mismo género y *Arabidopsis thaliana* por la basta información disponible. Se logra visualizar que los genes *EgloNAC18*, *EgloNAC35* y *EgloNAC36* se encuentran en un mismo clado, por otra parte, *EgloNAC47* se encuentra en un clado más lejano que los anteriores. Los porcentajes de identidad se encuentran disponibles en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentajes de identidad de genes ortólogos utilizados en Árbol filogenético.

Gen	Gen	Porcentaje de Identidad
<i>EgloNAC18</i>	<i>EgrNAC33</i>	98.82%
<i>EgloNAC18</i>	<i>ANAC029</i>	63.80%
<i>EgloNAC35</i>	<i>EgrNAC66</i>	96.60%
<i>EgloNAC35</i>	<i>ANAC072</i>	62.68%
<i>EgloNAC36</i>	<i>EgrNAC68</i>	99.40%
<i>EgloNAC36</i>	<i>ANAC021</i>	57.41%
<i>EgloNAC47</i>	<i>EgrNAC85</i>	91.83%
<i>EgloNAC47</i>	<i>ANAC086</i>	41.54%

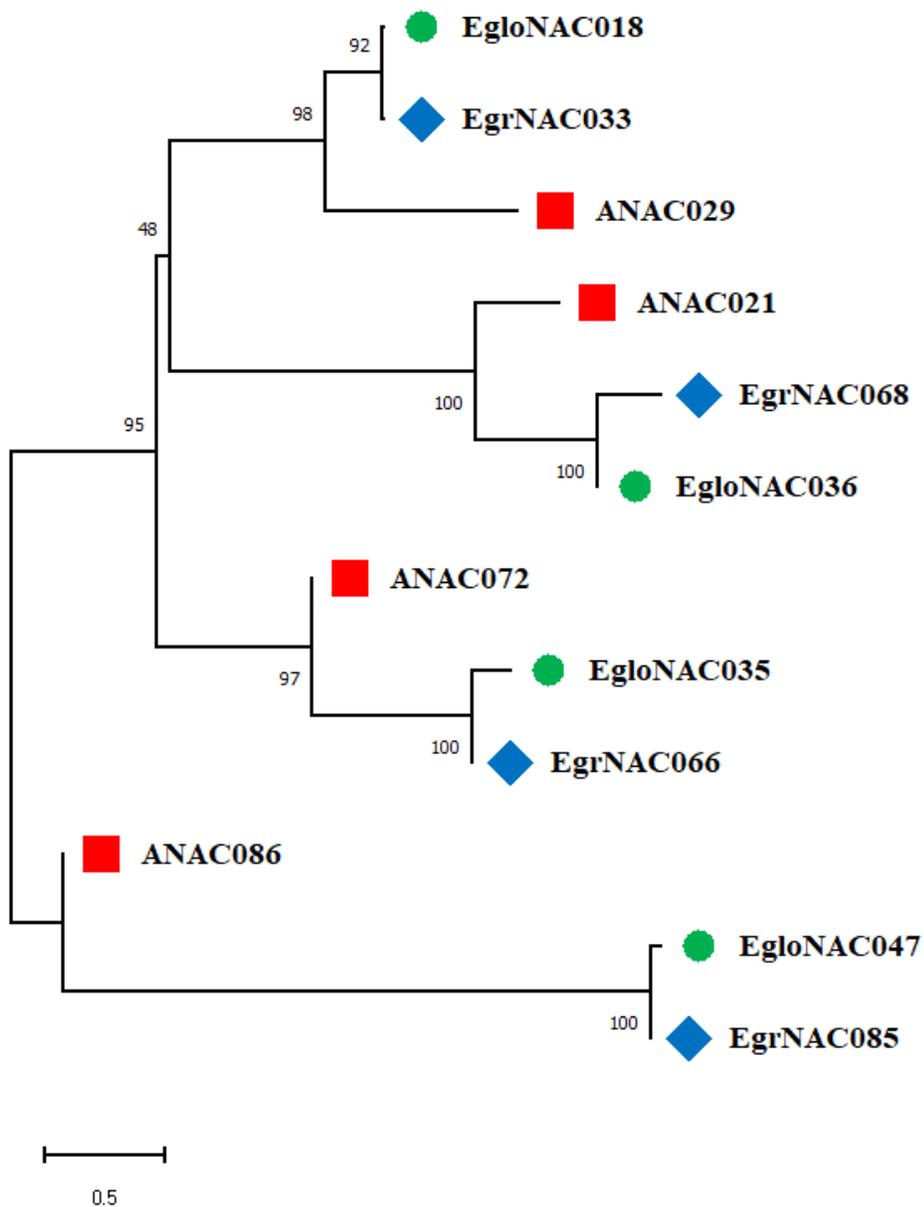


Figura 5: Árbol filogenético de Factores de transcripción *NAC* en *Eucalyptus globulus* (Círculo verde), *Eucalyptus grandis* (Diamante azul) y *Arabidopsis thaliana* (Cuadrado rojo). Secuencias completas de las proteínas *NAC* fueron alineadas usando ClustalW y la construcción del árbol fue mediante el método Neighbor-Joining en el software MEGA 11. El valor *bootstrap* fue de 1000 repeticiones.

3.5 Análisis de expresión relativa.

3.5.1 Análisis de expresión relativa del gen NAC18 de E. globulus (EgloNAC18).

En la figura 6 se ve representado los niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC18* en donde para el genotipo T1 se obtuvo un nivel de transcrito similar entre las condiciones AAH y NA, y una disminución del transcrito en la condición ADH de aproximadamente la mitad que la condición NA. Para el genotipo T2 se observó una disminución de transcrito bajo la condición AAH de aprox. tres veces menor que NA y en la condición ADH disminuyó aprox. dos veces el transcrito que NA. En el genotipo S1 se obtuvo una disminución del transcrito en la condición AAH de aprox. cuatro veces menor que NA y en ADH disminuyó casi en su totalidad el transcrito en comparación con NA. Para el genotipo S2 se obtuvo una disminución de transcrito en la condición AAH de la mitad que NA y en ADH disminuyó el transcrito en comparación con NA.

En el genotipo T2 se logra obtener diferencias significativas entre las condiciones NA y ADH, por otra parte, la condición AAH no presenta diferencias significativas. En el genotipo S1 se observan diferencias significativas entre las condiciones NA y condiciones aclimatadas (AAH y ADH).

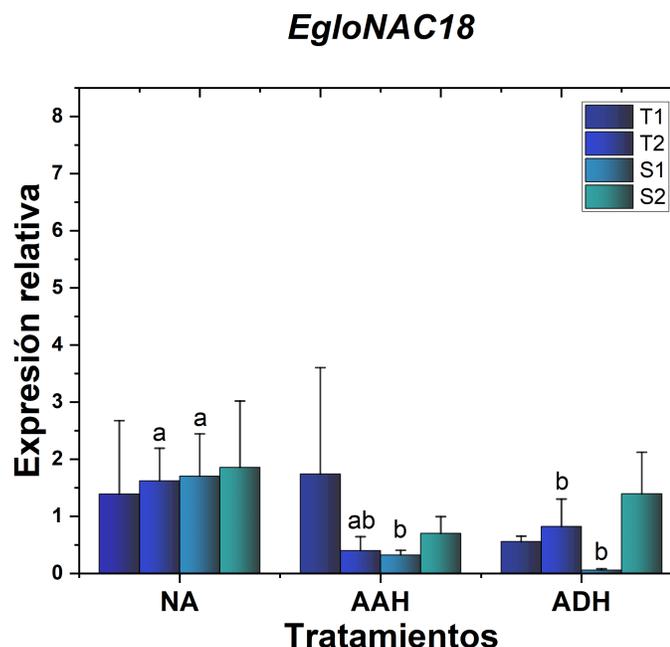


Figura 6: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC18* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando *α -tubulina* y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).

3.5.2 Análisis de expresión relativa del gen *NAC35* de *E. globulus* (*EgloNAC35*).

En la figura 7 se ve representado los niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC35* en el cual se obtuvo que el genotipo T1 aumentó el transcrito en la condición AAH aproximadamente 10 veces en comparación con NA y en la condición ADH el nivel de transcrito aumentó aprox. 20 veces más que NA. Para el genotipo T2 se observó un aumento de transcrito en la condición AAH aprox. 2 veces más que NA y en la condición ADH aumentó el transcrito aprox. 8 veces más que NA. Para el genotipo S1, se observó que AAH aumentó su transcrito aprox. 3 veces más que NA y en la condición

ADH aumentó el transcrito dos veces más que NA. S2 obtuvo que disminuyó el transcrito en las condiciones AAH y ADH en comparación con NA.

El genotipo T2 demostró diferencias significativas entre NA y ADH mientras que AAH no presentó diferencias significativas. Para el genotipo S1, se demostró diferencias significativas entre NA y AAH mientras que ADH no presentó diferencias significativas. Por otra parte, los genotipos T1 y S2 no demostraron diferencias significativas entre sus condiciones.

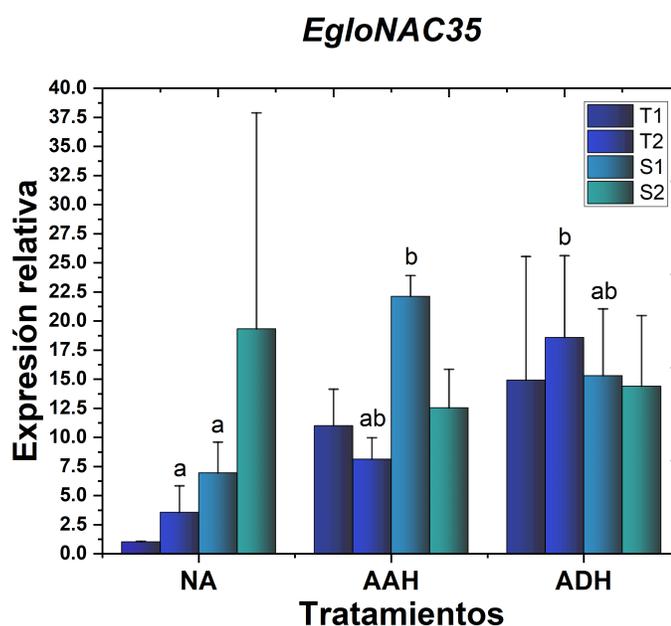


Figura 7: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC35* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando α -tubulina y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).

3.5.3 Análisis de expresión relativa del gen *NAC36* de *E. globulus* (*EgloNAC36*).

En la figura 8 se ve representado los niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC36* en el cual se obtuvo que el genotipo T1 aumentó su nivel de transcrito en la condición AAH en aproximadamente 4 veces más que NA y en la condición ADH aumentó su transcrito en aprox. 3 veces más que NA. Para el genotipo T2 su nivel de transcrito se mantuvo a pesar del tratamiento. El genotipo S1 disminuyó su nivel de transcrito en las condiciones AAH y ADH en comparación con NA. El genotipo S2 disminuyó su transcrito en las condiciones AAH y ADH en aprox. 3 veces en comparación con NA.

El genotipo T1 presentó diferencias significativas entre la condición NA y AAH, mientras que ADH no presentó diferencias significativas. El genotipo S2 presentó diferencias significativas entre la condición NA y aclimatadas (AAH y ADH). Finalmente, los genotipos T2 y S1 no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

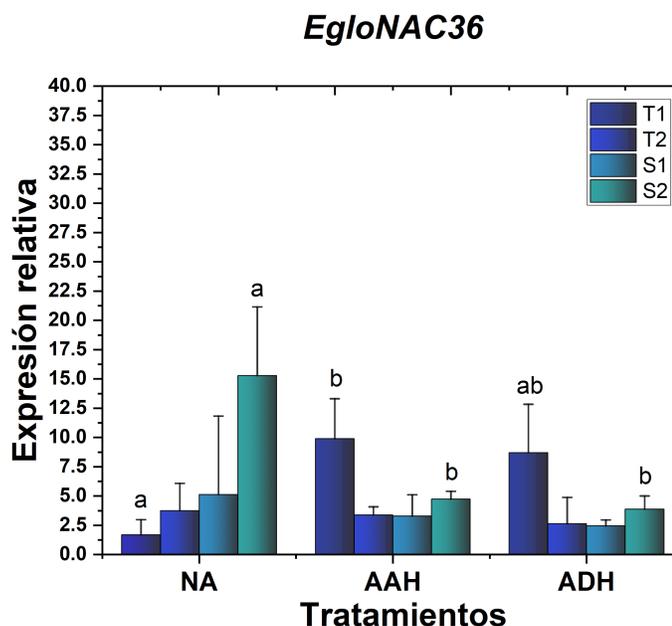


Figura 8: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC36* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando α -tubulina

y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).

3.5.4 Análisis de expresión relativa del gen *NAC47* de *E. globulus* (*EgloNAC47*).

En la figura 9 se ve representado los niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC47* en el cual se obtuvo que el genotipo T1 aumentó su nivel de transcrito en la condición AAH aproximadamente 4 veces más que NA y en la condición ADH aumentó su transcrito en aprox. casi el doble. Para el genotipo T2, se disminuyó su transcrito en la condición AAH en aprox. cuatro veces en comparación con NA y en la condición ADH disminuyó casi en su totalidad su transcrito. El genotipo S1 disminuyó su transcrito en la condición AAH en aprox. 4 veces en comparación con NA y en la condición ADH disminuyó casi en su totalidad. Para el genotipo S2, disminuyó su transcrito en la condición AAH en aprox. la mitad en comparación con NA y en la condición ADH disminuyó aprox. 6 veces en comparación con NA.

El genotipo T1 demostró diferencias significativas entre el control (NA) y AAH, mientras que ADH no presentó diferencias significativas. El genotipo T2 demostró diferencias significativas entre el control (NA) y aclimatadas (AAH y ADH). Para el genotipo S1, existen diferencias significativas entre NA y condiciones aclimatadas (AAH y ADH). Finalmente, el genotipo S2 no demostró diferencias significativas entre las distintas condiciones, pero sí se logra observar una disminución de la expresión del gen entre AAH y ADH con NA.

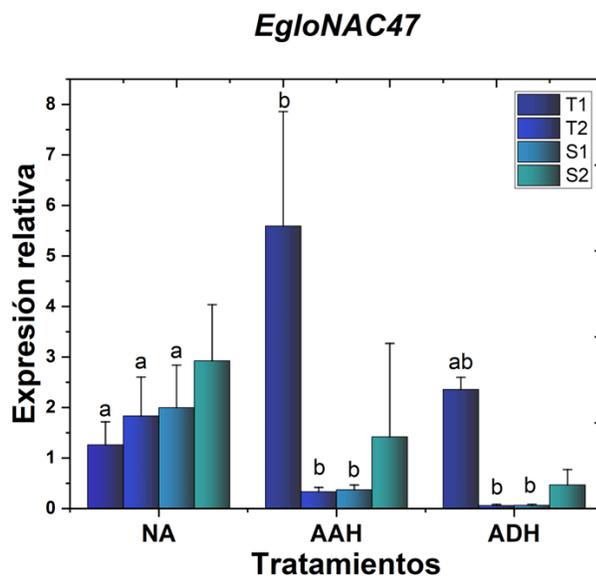


Figura 9: Niveles de expresión relativa del gen *EgloNAC47* en hojas con 4 distintos genotipos de *E. globulus* (T1, T2, S1 y S2) bajo ensayo de aclimatación con heladas (NA: No Aclimatado, AAH: Aclimatado antes de Helada, ADH: Aclimatado Después de Helada). Los niveles de expresión fueron determinados por qRT-PCR usando *α-tubulina* y *UBC* como genes de referencia. Letras arriba de las barras (a y b) indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test Tukey, $p \leq 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

Para reconocer el dominio dentro de la secuencia proteica de los genes de estudio (*EgloNAC18*, *EgloNAC35*, *EgloNAC36* y *EgloNAC47*) se debe encontrar su dominio conservado “NAC” el cual se encuentra en la región N-terminal (aproximadamente 150 aminoácidos) altamente conservada que se divide en cinco subdominios(A-E), basado en distribución de motivos (Puranik *et al.* 2012), de esta manera se puede confirmar que los genes de *E. globulus* presentes en la tabla 2 son miembros de la familia NAC, ya que, todos presentan el dominio conservado NAM, siendo estos ubicados al principio de la secuencia. La estructura proteica de la familia NAC (anexo 1) descrita por Liu en 2023 ayuda a relacionar los motivos presentes en el apéndice 1 con los subdominios descritos anteriormente de la zona N-terminal. Al comparar los subdominios encontrados en las secuencias proteicas de tres genes *NAC* de soya (*Glycine max*) (*GmNAC11*, *GmNAC20* y *GmNAC35*) (Hao *et al.* 2010) con los motivos encontrados en los genes descritos de la tabla 2 se obtuvo que el subdominio A encargado de la dimerización de FT (Ooka *et al.* 2003) se asemeja al motivo 3 descrito en la tabla 2. El subdominio C se asemeja al motivo 2 y el D se asemeja al motivo 1, los cuales se encuentran altamente conservados y son ricos en residuos de aminoácidos cargados positivamente e involucrados en la unión del ADN junto con el transporte nuclear (Wang y Dane 2013). Por otra parte, los subdominios B y E se encuentran menos conservados que el resto y se relacionan con la diversidad funcional del gen *NAC* (Wang *et al.* 2022). El subdominio E presente en genes *NAC* de Ajo (*Allium sativum*) se asemeja al motivo 4 descrito en la tabla 2. Finalmente, el subdominio B es el menos conservado, no obstante, se encuentra presente en 3 genes (*EgloNAC18*, *EgloNAC35* y *EgloNAC36*) y se asemeja al motivo 5. Estos subdominios son todos similares y se encuentran también presentes en especies como Mandarina (*Citrus Nobilis*) y Tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Zhan *et al.* 2018, de Oliveira *et al.* 2011).

El árbol filogenético presente en la figura 5 indica que los genes *EgloNAC18*, *EgloNAC35*, *EgloNAC36* y *EgloNAC47* poseen su ortólogo en *E. grandis*, los cuales son: *EgrNAC33*, *EgrNAC66*, *EgrNAC68* y *EgrNAC85* respectivamente, coincidiendo con el árbol filogenético descrito por Hussey al encontrarse estos genes en un mismo clado (Hussey *et al.* 2015). En el dendograma publicado por Hussey en 2015, se puede observar que incluye genes *NAC* de *A. thaliana*, de los cuales *ANAC029* y *ANAC021* coinciden con los resultados presentados en la figura 5 al unirse respectivamente, a los genes *EgrNAC33* y *EgrNAC68*. Hurtado en su árbol filogenético de genes *NAC* igual agrupó a los genes *EgrNAC033* y *EgrNAC68* muy cercanos con *ANAC029* y *ANAC021* respectivamente (Hurtado *et al.* 2019). Hussey en 2015 presenta que el gen *ANAC055* es ortólogo de *EgrNAC66* el cual presenta un 61.85% de identidad. Por otra parte, Hurtado presenta que *EgrNAC66* es ortólogo de *ANAC072* y este posee un 62.68% de identidad por lo que coincide este último resultado al del obtenido en la figura 5. Para el ortólogo en *A. thaliana* del gen *EgloNAC47* se considerará un 41.54% de identidad con *ANAC086* en la figura 5. Hussey y Hurtado sostienen que *ANA049* se le asemeja como ortólogo, pero este solo alcanza un 30.41% de identidad proteica (Hussey *et al.* 2015, Hurtado *et al.* 2019).

Genes del dominio NAC en *Eucalyptus spp* ya han presentado diferencias significativas en sus niveles de expresión entre condiciones NA y ADH tal como el gen *RD26* en *Eucalyptus nitens*, ortólogo de *NAC35* en *E.globulus*, al momento de sufrir una helada de -2°C (Gaete *et al.* 2017). Estudios sobre el gen *ANAC029* apuntan a su influencia en procesos biológicos de división celular, expansión de estambres y pétalos. También, se documenta que el gen *NAP(ANAC029)* participa en la biosíntesis de ABA, el cual se ha descrito que acelera la senescencia y es requerido para la tolerancia a la congelación (Panigrahy *et al.* 2022), ya que regula positivamente la expresión de *AAO3*, gen que cataliza eficientemente el último paso de la biosíntesis de ABA (Seo *et al.* 2000), provocando un aumento hormonal de ABA e induciendo la expresión de genes relacionados con la degradación de clorofila. Análisis filogenéticos en Lilia (*Lilium*

oriental) mostraron que *LoNAC29* y *ANAC029* se encuentran emparentados y la sobreexpresión de *LoNAC29*, el cual posee un porcentaje de identidad de 67.48% con *EgloNAC18*, acelera significativamente la senescencia, (Luo *et al.* 2021). *EgloNAC18* tiene 63.80% de identidad proteica con *ANAC029* de *A.thaliana*, el cual se ha asociado a la senescencia y disminuye su expresión al momento de sufrir estrés por frío (18°C) y oscuridad. Concordando con la disminución en la expresión del transcrito del gen *EgloNAC18* presente en la figura 6 cuando se ve sometido a condiciones aclimatadas (AAH y ADH) siendo en T2 y S1 significativo en sus niveles de expresión relativa (Panigrahy *et al.* 2021). Asociando su disminución en la expresión de transcrito como posible gen asociado a la tolerancia de bajas temperaturas.

El gen *EgloNAC35* presentó un 62.68% de identidad proteica con *ANAC072* de *A.thaliana* y se ha documentado su participación en procesos de senescencia foliar y degradación de clorofila, debido a que promueve la expresión del gen *NYE1* involucrado en este proceso. También, se sabe que el gen *ANAC072* es clasificado en el subgrupo III de la familia *NAC* de *A. thaliana* junto con *ANAC055* y *ANAC019*, los cuales son considerados homólogos, estos genes presentan patrones de expresión similares y funciones redundantes, estos genes están regulados positivamente en respuesta a sequía y estrés salino, al igual que las vías de ácido abscísico (ABA) y metil jasmonato (MeJA) (Li *et al.* 2016, Li *et al.* 2012). La sobreexpresión del gen *ANAC055* en plantas mutantes mostraron una expresión mejorada de *Vegetative storage protein (VSP1)* asociado a sitios de unión de FT, al igual que *Lipoxygenase2 (LOX2)*, asociado a la defensa de la planta (Bu *et al.* 2008, Gallardo 2012). El gen *ANAC055* ha demostrado que funciona en vías de respuesta y tolerancia al estrés abiótico inducido a través de estrés por frío (de Oliveira *et al.* 2011). También, *ANAC055* demuestra su posible rol de sinergia o antagonismo en las señalizaciones de ABA (Li *et al.* 2012). En soya el gen *GmSNAC23*, homólogo de *ANAC072*, presenta un 71% de identidad proteica y se ha demostrado un aumento en la expresión en tratamientos con bajas temperaturas (4°C) alcanzando su máxima expresión después de 24 hr. (So *et al.* 2019). En apio (*Apium graveolens*) el gen

AgNAC63, que es homólogo de *ANAC072*, presentó diferencias significativas en los niveles de expresión a las 4 y 24 horas después de someter las plantas a un tratamiento con bajas temperaturas (4°C) (Duan *et al.* 2020). Por lo tanto, el aumento de la expresión del gen *EgloNAC35* presente en la figura 8 en los genotipos T2 y S1 tras pasar por un proceso de aclimatación al frío (AAH y ADH) sugiere una relación directa con la respuesta al estrés por frío.

El gen *EgloNAC36* presentó un 57.41% de identidad proteica con *ANAC021* perteneciente a *A. thaliana*. Plantas transgénicas con genes de Pitaya (*Hylocereus undatus*) insertos, demostraron que genes del subgrupo filogenético A2, entre ellos *ANAC021* son altamente inducidos por el estrés al frío y se describen como activadores transcripcionales. Además, el gen *HuNAC25* presenta un 61.88% de identidad proteica con *EgloNAC36* y su sobreexpresión en líneas transgénicas sometidas a bajas temperaturas (5°C) aumentó significativamente su tolerancia al estrés por frío, gracias a la disminución de fuga de iones, reducción del contenido de malondialdehído, aumento en la acumulación de H₂O₂ y O₂. Asociando a este gen con la regulación al alza de la expresión de genes sensibles al frío (*AtRD29A*, *AtCOR15A*, *AtCOR47*, y *AtKINI*). En la figura 9, el genotipo T1 aumenta su expresión significativamente ante condiciones de bajas temperaturas (AAH y ADH) por lo que concuerda con el aumento de la expresión de *HuNAC25* en similares condiciones. El genotipo S2 muestra una disminución significativa en la expresión en comparación con tratamientos aclimatados, asociando su baja supervivencia (figura 4) con la reducción en sus niveles de expresión (Hu *et al.* 2022). Por otra parte, el gen *MbNAC25* de Manzana (*Malus domestica*) consta con un 46.11% de identidad proteica con *EgloNAC36*. Dicho esto, Han describe al gen *MbNAC25* como inducido por estrés abiótico, entre ellos el estrés por frío. Su sobreexpresión en líneas transgénicas de *A.thaliana* demostró que las plantas sometidas a bajas temperaturas (5°C) mejoran su tolerancia al frío, debido a un aumento significativo en los niveles de clorofila, contenido de prolina y actividad enzimática

antioxidante de tres enzimas, SOD (superóxido dismutasa), POD (peroxidasa) y CAT (catalasa) en comparación con las plantas tipo salvaje (Han *et al.*2020).

El gen *EgloNAC47* presentó un 41.54% de identidad proteica con *ANAC086* perteneciente a *A. thaliana*, gen que según Zhang en 2018 se encuentra asociado a los genes *SiNAC69* y *SiNAC13* de sésamo (*Sesamum indicum*), perteneciendo al subgrupo 3 del árbol filogenético presentado por el autor, se documenta que bajo tratamiento al frío (5°C) el gen *SiNAC13* es altamente inducido por bajas temperaturas y regula positivamente la expresión. Por el contrario, este mismo gen *SiNAC13* regula negativamente la expresión bajo tratamiento de estrés salino (Zhang *et al.* 2018). En la especie *Kandelia obovata* se ha evidenciado que el gen *KoNAC18*, homólogo del gen *ANAC086*, posee respuestas ante bajas temperaturas (4°C) al aumentar su expresión, esto concuerda con el resultado visto por el genotipo T1 de la figura 9 (Du *et al.* 2022). No obstante, estos resultados no concuerdan con la disminución de la expresión génica presentada por el resto de genotipos

Al momento de involucrar el proceso de aclimatación con la conferencia de tolerancia al estrés por frío en plantas de *E. globulus* es clave tener en cuenta a los FT NAC, ya que se ha demostrado que son inducidos por el frío y que participan en diversos procesos moleculares. Los cuatro genes sujetos a estudio demostraron un aumento o disminución del transcrito en todos los genotipos al momento de cambiar de condición, lo que implica su estrecha relación con el estrés por frío. El proceso de aclimatación demostró ser clave para la evaluación de los niveles de transcrito y ayuda a entender de una mejor forma el comportamiento de estos genes. Estos mecanismos de respuesta ayudan a la planta a sobrellevar instancias adversas como las heladas primaverales o bajas de temperaturas repentinas.

V. CONCLUSIONES.

Los cuatro genes sujetos a estudio resultaron ser parte de la familia NAC al confirmar su dominio NAM presente en su secuencia proteica. Se identificaron motivos presentes que se asociaron a los subdominios NAC descritos (A, B, C, D y E). Se determinaron dos genotipos tolerantes y dos susceptibles con los porcentajes de supervivencia.

El gen *EgloNAC18* presentó una disminución del transcrito significativo en genotipo susceptible y tolerante tras tratamiento. En los cuatro genotipos mostró una disminución del transcrito

El gen *EgloNAC35* presentó un aumento del transcrito significativo en genotipo susceptible y tolerante tras tratamiento y fue el gen con más cambios en sus niveles de expresión entre tratamientos.

El gen *EgloNAC36* presentó un aumento del transcrito significativo en genotipo tolerante y una disminución del transcrito significativo en genotipo susceptible.

El gen *EgloNAC47* presentó discrepancia entre genotipos tolerantes ya que uno aumentó su transcrito y otro lo disminuyó. Para el genotipo susceptible se observó una disminución significativa del transcrito.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo E. 2008. Efectos del establecimiento en el crecimiento y rentabilidad de plantaciones de eucaliptus en el sur de Chile. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile.
2. Aguayo P., C. Lagos, D. Conejera, M. Fernández, S. Valenzuela. 2019. Transcriptome-wide identification of WRKY family genes and their expresión under cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. *Trees* 33(5): 1313-1327.
3. Aguayo P., M. Fernández, C. Balocchi, S. Valenzuela. 2022. An overview of cold stress responses in *Eucalyptus globulus*. *Trees*.
4. Aida M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa, M. Tasaka. 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9: 841–857.
5. Baillo E.H., R.N. Kimotho, Z. Zhang, P. Xu. 2019. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes* 10(10): 771.
6. Balmelli G., N. Altier, V. Marroni. 2007. Daños provocados por enfermedades foliares y por heladas en *Eucalyptus globulus*. II. Control genético y correlaciones genéticas con parámetros productivos. *Boletín del CIDEU* 3: 77-82.
7. Balmelli G. y Resquin F. 2005. Evaluación productiva de orígenes de *Eucalyptus globulus* en zonas Litoral y Norte. Serie Técnica N° 149. INIA. Montevideo. Uruguay
8. Brinkmann F. 1992. Estudio de mercado y análisis económico de plantaciones de eucalipto. Proyecto de Título Ing. Agrónomo, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía.

9. Broschat T. K. 2013. Cold Damage on Palms. ENH-92. Series of the Environmental Horticulture Department, University of Florida. IFAS Extension.
10. Bu Q., H. Jiang, C. Li, Q. Zhai, J. Zhang, X. Wu, J. Sun, Q. Xie, C. Li. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research* 18(7): 756–767.
11. Chantal T., B. Gerd, M. Gavin, M. Christiane. 2007. Stress studies in *Eucalyptus*.
12. Chinnusamy V., J. Zhu, J.K. Zhu. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Science* 12(10): 444-51.
13. de Oliveira T., L. Cidade, A. Gesteira, M. Coelho, W. Soares, M. Costa. 2011. Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses. *Tree Genetics & Genomes* 7(6): 1123–1134.
14. Dong Y., T. Mingjia, H. Zelan, S. Jianing, X. Jin, J, A, Golam, Y. Jingquan, Z. Yanhong. 2022. The miR164a-NAM3 module confers cold tolerance by inducing ethylene production in tomato. *The Plant Journal* 111(2): 440-456.
15. Duan A., X. Yang, K. Feng, J. Liu, Z. Xu, A. Xiong. 2020. Genome-wide analysis of NAC transcription factors and their response to abiotic stress in celery (*Apium graveolens* L.). *Computational Biology and Chemistry* 84(107186): 107186.
16. Duval M., H. Tzung-Fu, K. Soo Young, T. Terry. 2022. Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* 50(2): 237-248.

17. Du Z., S. You, D. Yang, Y. Tao, Y. Zhu, W. Sun, Z. Chen, J. Li. 2022. Comprehensive analysis of the NAC transcription factor gene family in *Kandelia obovata* reveals potential members related to chilling tolerance. *Frontiers in Plant Science* 13: 1048822.
18. Fernández M., S. Valenzuela, C. Balocchi. 2006. RAPD and freezing resistance in *Eucalyptus globulus*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(3).
19. Gaete J., C. Lagos, M. Beltrán, S. Valenzuela, V. Emhart, M. Fernández. 2017. Transcriptome profiling of *Eucalyptus nitens* reveals deeper insight into the molecular mechanism of cold acclimation and deacclimation process. *Tree Genetics & Genomes*, 13(2).
20. Gallardo Negerete José de Jesús. 2012. Papel de la Proteína SM-1 de *Trichoderma virens* en la inducción del priming en *Arabidopsis thaliana*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
21. Han D., M. Du, Z. Zhou, S. Wang, T. Li, J. Han, T. Xu, G. Yang. 2020. Overexpression of a *Malus baccata* NAC transcription factor gene MbNAC25 increases cold and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1198.
22. Hao Y., Q. Song, H. Chen, H. Zou, W. Wei, X. Kang, B. Ma, W. Zhang, J. Zhang, S. Chen. 2010. Plant NAC-type transcription factor proteins contain a NARD domain for repression of transcriptional activation. *Planta* 232(5): 1033–1043.

23. Hu X., F. Xie, W. Liang, Y. Liang, Z. Zhang, J. Zhao, G. Hu, Y. Qin. 2022. HuNAC20 and HuNAC25, two novel NAC genes from pitaya, confer cold tolerance in transgenic Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences* 23(4): 2189.
24. Hurtado F., M. Pinto, P. Oliveira, D. Riaño-Pachón, L. Inocente, H. Carrer. 2019. Analysis of NAC domain transcription factor genes of *Tectona grandis* L.f. Involved in secondary cell wall deposition. *Genes* 11(1): 20.
25. Hussey S, M. Saïdi, C. Hefer, A. Myburg, J. Grima-Pettenati. 2015. Structural, evolutionary and functional analysis of the NAC domain protein family in *Eucalyptus*. *New Phytol* 206(4): 1337-1350.
26. INFOR I.F. 2003. *Eucalyptus nitens*: La nueva estrella del sector forestal. 59-61.
27. INFOR I.F. 2021. El sector forestal chileno.
28. Joshi R., S. Wani, B. Singh, A. Bohra, Z. Dar, A. Lone, A. Pareek, S. Singla-Pareek. 2016. Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Plant Science* 7: 1029.
29. Keller G., P.B. Cao, H. San Clemente, W. El Kayal, C. Marque, C. Teulières. 2013. Transcript profiling combined with functional annotation of 2,662 ESTs provides a molecular picture of *Eucalyptus gunnii* cold acclimation. *Trees* 27(6): 1713–1735.
30. Kimotho R.N., E.H. Baillo, Z. Zhang. 2019. Transcription factors involved in abiotic stress responses in Maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era. *Peer J* 8(7).

31. Kirkpatrick J. 1974. The numerical intraspecific taxonomy of *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 69(2): 89-104.
32. Li S., J. Gao, L. Yao, G. Ren, X. Zhu, S. Gao, K. Qiu, X. Zhou, B. Kuai. 2016. The role of ANAC072 in the regulation of chlorophyll degradation during age- and dark-induced leaf senescence. *Plant Cell Reports* 35(8): 1729–1741.
33. Li X., L. Li, X. Liu, B. Zhang, W. Zheng, W. Ma. 2012. Analysis of physiological characteristics of abscisic acid sensitivity and salt resistance in *Arabidopsis* ANAC mutants (ANAC019, ANAC072 and ANAC055). *Biotechnology, biotechnological equipment*, 26(3): 2966–2970.
34. Liu J., Y. Qiao, C. Li, B. Hou. 2023. The NAC transcription factors play core roles in flowering and ripening fundamental to fruit yield and quality. *Frontiers in Plant Science* 14.
35. Livak K., T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
36. Luo J., R. Li, X. Xu, H. Niu, Y. Zhang, C. Wang. 2021. SMRT and Illumina RNA sequencing and characterization of a key NAC gene LoNAC29 during the flower senescence in *Lilium oriental* “Siberia”. *Genes* 12(6): 869.
37. Mehari T.G., Y. Hou, Y. Xu. M. Jawad, M. Linyerera, Y. Wang, H. Wang, R. Peng, Y. Wei, X. Cai, Z. Zhou, F. Liu. 2022. Overexpression of cotton *GhNAC072* gene enhances drought and salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 23(1): 648

38. Mittler R. y E. Blumwald. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Plant Biology* 61(1): 443–462.
39. Nakashima K., P. Lam-Son, D. Van Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama, D. T. Yusuke, N. Hayashi, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51(4): 617-630.
40. Ooka H., K. Satoh, K. Doi, T. Nagata, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara, N. Osato, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Suzuki, K. Kojima, Y. Takahara, K. Yamamoto, S. Kikuchi. 2003. Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 10(6): 239–247.
41. Panigrahy M., A. Singh, S. Das, K. Panigrahi. 2022. Co-action of ABA, brassinosteroid hormone pathways and differential regulation of different transcript isoforms during cold-and-dark induced senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 31(3): 489–510.
42. Pearce R.S. 2001. Plant freezing and damage. *Ann Bot* 87: 417–424.
43. Puranik S., P. Sahu, P. Srivastava, M. Prasad. 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science* 17(6): 369–381.
44. Ruíz F., G. Toval, A. Reyes. 2008. Selvicultura de *Eucalyptus globulus* Labill. COMPENDIO DE SELVICULTURA APLICADA EN ESPAÑA, INIA Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. 117-154.

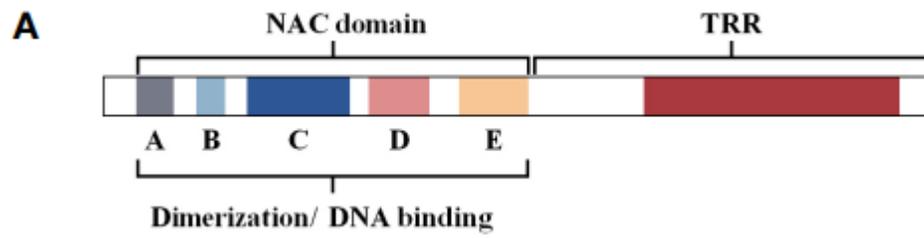
45. Rui Z., P. Wenqiu, Z. Qinlong, H. Haibo, L. Xiuhua, X. Liheng, J. Huining, S. Kuijun, N. Xiaojun. 2023. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of NAC gene family under salt stress in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*. L). *International Journal of Biological Macromolecules* 230.
46. Seo M., A. Peeters, H. Koiwai, T. Oritani, A. Marion-Poll, J. Zeevaart, M. Koornneef, Y. Kamiya, T. Koshiba. 2000. The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23): 12908–12913.
47. Shao H, H. Wang, X. Tang. 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front. Plant Science* 6: 902.
48. Shinozaki K., Y. Shinozakiy, M. Sekiz. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Plant Biology* 6: 410–417.
49. So H., J. Lee. 2019. NAC transcription factors from soybean (*Glycine max* L.) differentially regulated by abiotic stress. *Journal of Plant Biology*. 62(2): 147–160.
50. Souer E, A.V Houwelingen, D. Kloos, J. Mol, R. Koes. 1996. The No Apical Meristem Gene of Petunia Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and Is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries. *Cell*. 85(2): 159–70.
51. Srivastava R., S. Kumar, Y. Kobayashi, K. Kusunoki, P. Tripathi, Y. Kobayashi, H. Koyama, L. Sahoo. 2018. Comparative genome-wide analysis of WRKY transcription factors in two Asian legume crops: Adzuki bean and Mung bean. *Scientific Reports* 8(1): 16971.

52. Srivastava R., Y. Kobayashi, H. Koyama, L. Sahoo. 2022. Overexpression of cowpea NAC transcription factors promoted growth and stress tolerance by boosting photosynthetic activity in *Arabidopsis*. *Plant Science* 319(111251).
53. Su H., S. Zhang, Y. Yin, D. Zhu, L. Han. 2015. Genome-wide analysis of NAM-ATAF1, 2-CUC2 transcription factor family in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 24(2): 176–183.
54. Wang G., Y. An, C. Zhou, Z. Hu, X. Ren, A. Xiong. 2022. Transcriptome-wide identification of NAC (no apical meristem/*Arabidopsis* transcription activation factor/cup-shaped cotyledon) transcription factors potentially involved in salt stress response in garlic. *PeerJ* 10.
55. Wang H., H. Shao, X. Tang. 2016. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Frontiers in Plant Science* 7(67).
56. Wang Z, F. Dane. 2013. NAC (NAM/ATAF/CUC) transcription factors in different stresses and their signaling pathway. *Acta Physiol Plant* 35(5): 1397–1408.
57. Warsi M. K., S. Howladar, M. Alsharif. 2022. Regulon: An overview of plant abiotic stress transcriptional regulatory system and role in transgenic plants. *Brazilian Journal of Biology* 83.
58. Yuan T., J. Liang, J. Dai, X. Zhou, W. Liao, M. Guo, M. Aslam, S. Li, G. Cao, S. Cao. 2022. Genome-wide identification of *Eucalyptus* heat shock transcription factor family and their transcriptional analysis under salt and temperature stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 23(14): 8044.

59. Zhan P., S. Ke, P. Zhang, C. Zhou, B. Fu, X. Zhang, T. Zhong, S. Chen, X. Xie. 2018. Overexpression of two cold-responsive ATAF-like NAC transcription factors from fine-stem stylo (*Stylosanthes guianensis* var. *intermedia*) enhances cold tolerance in tobacco plants, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 135(3): 545–558.

60. Zhang Y., D. Li, Y. Wang, R. Zhou, L. Wang, Y. Zhang, J. Yu, H. Gong, J. You, X. Zhang. 2018. Genome-wide identification and comprehensive analysis of the NAC transcription factor family in *Sesamum indicum*. *Public Library of Science One* 13(6).

VI. ANEXO.



Anexo 1: Estructura de una proteína perteneciente a la familia NAC