



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

**Factores de transcripción MYB-R2R3 en el transcriptoma
en respuesta a baja temperatura de
*Eucalyptus nitens***

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

MYRIAM ALEJANDRA SOLÍS GARCÍA
CONCEPCIÓN – CHILE
2019

Profesor Guía: Alexis Salas Burgos
Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el en el Laboratorio de Bioinformática del Departamento de Farmacología la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción y en el Laboratorio de Genómica Forestal del Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dr. Alexis Salas
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora



Dra. Marta Fernández
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Dra. Sofía Valenzuela
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Amparo Uribe
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por el amor, la amistad, la fuerza que reflejan cada uno día a día, por nunca dejarme flaquear y por enseñarme lo que significa luchar por lo que quieres. Por el ejemplo de perseverancia que sin duda es la causa que me llevan a finalizar esta etapa de mi vida.

A mi profesor guía Alexis Salas, quien desde el primer día tuvo la mejor disposición y confió en mí para desarrollar no solo trabajos de investigación, sino también sociales. Por su espíritu científico-inquieto que de seguro lo llevarán a desarrollar grandes aportes en la ciencia.

A la profesora Marta Fernández que fue una guía en esta etapa de mi formación, por todas las herramientas y conocimientos entregados e incalculable aporte a mi formación profesional.



A la profesora Sofía Valenzuela, por confiar en mí y darme las herramientas y conocimientos para el desarrollo de la tesis.

Al Laboratorio Nanocell por la oportunidad de trabajar en conjunto a todos los que lo conforman y sobre todo a aquellos que aportaron de manera desinteresada sus conocimientos para la realización de este trabajo.

A la Srta. Cecilia Castex Inzunza que sé nunca ha dejado de apoyarme y protegerme gracias por su amor, su enseñanza y por sobre todo ser una luchadora en esta vida. Un beso hasta el cielo.

A mí hijo que sin duda es el principal motor en mi vida y en la de mi compañero de vida Felipe.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Industria forestal y generalidades de <i>Eucalyptus spp.</i>	1
1.2 <i>E.nitens</i> , especie tolerante a frío	2
1.3 Mecanismo en plantas de respuesta a estrés por baja temperatura	2
1.4 Factores de transcripción asociados a la respuesta a estrés por baja temperatura.	4
1.5 Factores de transcripción MYB	5
1.6 Antecedentes del rol de factores de transcripción MYB-R2R3 en respuesta a estrés por baja temperatura.....	7
1.7 Estudios transcripcionales en <i>E.nitens</i> en respuesta a baja temperatura	8
2 HIPÓTESIS.....	10
3 OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivo específicos	10
4 MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1 Material disponible	11
4.2 Reensamble del transcriptoma de <i>E.nitens</i>	12
4.3 Establecer la identidad de los factores de transcripción MYB de <i>E. nitens</i> con los presentes el genoma de <i>E.grandis</i>	13
4.4 Evaluación de la expresión diferencial <i>in silico</i> de los factores de transcripción MYB-R2R3 de <i>E.nitens</i> en el perfil de aclimatación a baja temperatura	15
4.5 Evaluación por qRT-PCR de los factores de transcripción seleccionados en resouesta a frío en <i>Eucalyptus spp.</i>	16

4.6	Análisis filogenético y asociación funcional.....	19
5	RESULTADOS	20
5.1	Reensamble de secuencias del transcriptoma de <i>E.nitens</i>	20
5.2	Identidad de los transcritos de <i>E.nitens</i> con los factores de transcripción MYB anotados en <i>E. grandis</i>	21
5.3	Expresión diferencial <i>in silico</i> de los factores de transcripción MYB-R2R3 de <i>E.nitens</i> en el perfil de aclimatación a baja temperatura	29
5.3.1	Visualización y exploración de los datos.....	29
5.3.2	Identificación de genes expresados diferencialmente	36
5.4	Evaluación de la expresión qRT-PCR de los factores de transcripción MYB-R2R3 de <i>E.nitens</i> en el perfil de aclimatación a baja temperatura.....	41
5.5	Análisis filogenético y asociación funcional EucniMYB64 y EucniMYB68... ..	42
6	DISCUSIÓN	48
7	CONCLUSIÓN	52
8	BIBLIOGRAFÍA	53
9	ANEXO	65
	Anexo 1: Factores de transcripción MYB de <i>Eucalyptus grandis</i>	65
	Anexo 2: Secuencias nucleotídicas y peptídicas de los factores de transcripciónMYB.....	69
	Anexo 3: Predicción del dominio, estructura secundaria y modelo de los factores de transcripción MYB-R2R3.....	79
	Anexo 4: Correlación de los valores de FC, estimados por qRT-PCR y por análisis <i>in silico</i>	80
	Anexo 5: Comparaciones de los valores de FC estimados por qRT-PCR y en la expresión <i>in-silico</i> por edgeR en los tratamientos de aclimatación en frío.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Clasificación de las proteínas MYB	6
Figura 2:	Perfil de aclimatación a frío con cuatro condiciones.....	12
Figura 3:	Alineamiento múltiple de secuencias del dominio MYB.....	27
Figura 4:	Estructura de los dominios R2 y R3 de EucniMYB64.....	28
Figura 5:	Gráfico MDS para la comparación NA-AAH.....	30
Figura 6:	Gráfico MDS para la comparación NA-ADH.....	31
Figura 7:	Gráfico MDS para la comparación NA-DA.....	32
Figura 8:	Gráfico MDS para la comparación AAH-ADH.....	33
Figura 9:	Gráfico MDS para la comparación AAH-DA.....	34
Figura 10:	Gráfico MDS para la comparación ADH-DA.....	35
Figura 11:	Mapa de calor para el tratamiento de aclimatación a frío por análisis <i>in silico</i> de los factores de transcripción MYB R2R3 en el transcriptoma de <i>Eucalyptus nitens</i>	38
Figura 12:	Mapa de calor para el tratamiento de desaclimatación a frío por análisis <i>in silico</i> de los factores de transcripción MYB R2R3 en el transcriptoma de <i>Eucalyptus nitens</i>	39
Figura 13:	Análisis de la acumulación de transcritos de <i>MYB64</i> y <i>MYB68</i>	42
Figura 14:	Análisis filogenético de las 10 proteínas R2R3-MYB de <i>Eucalyptus nitens</i>	43
Figura 15:	Redes de interacciones proteína-proteína	44
Figura 16:	Mapa de calor para de <i>Eucalyptus nitens</i> de las proteínas que interactúan con EucniMYB64 y EucniMYB68.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Partidores utilizados en qRT-PCR.....	18
Tabla 2:	Métricas de los ensamblados del transcriptoma de <i>Eucalyptus nitens</i> en respuesta a aclimatación a baja temperatura.....	20
Tabla 3:	Similitud de secuencias del transcriptoma de <i>Eucalyptus nitens</i> con los factores de transcripción MYB de <i>Eucalyptus grandis</i> por BLASTn.....	21
Tabla 4:	Tamaño de contigs identificados.....	23
Tabla 5:	Similitud de los 20 factores de transcripción MYB de <i>Eucalyptus nitens</i> con <i>E. grandis</i> por BLASTx.....	24
Tabla 6:	Similitud de secuencias de los 10 factores de transcripción MYB-R2R3 de <i>Eucalyptus nitens</i> con dominio predicho.....	25
Tabla 7:	Bibliotecas utilizadas para realizar el análisis de expresión diferencial.....	36
Tabla 8:	Resumen de la cantidad de genes expresados diferencialmente.....	37
Tabla 9:	Valores de expresión (FC) obtenidos mediante el análisis de expresión <i>in silico</i> para los 20 MYB-R2R3.....	40
Tabla 10:	Valores de expresión (FC) obtenidos mediante el análisis de expresión <i>in silico</i> para las proteínas identificadas en STRING en el transcriptoma de <i>Eucalyptus nitens</i>	47

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADNg: ADN genómico

ARN: Ácido ribonucleico

BCV: Biological coefficient variation

BLAST: Basic local alignment search tool

CDS: Coding sequence

edgeR: Empirical analysis of digital gene expression data in R

FC: Fold-change

FDR: False discovery rate

LEA: Late embryogenesis abundant

MDS: Multidimensional scaling

MYB: Myeloblastosis

ORF: Open reading frame

ROS: Reactive oxygen species

PCR: Polymerase chain reaction



RESUMEN

Eucalyptus nitens (Deane & Maiden) Maiden. es una de las especies del género *Eucalyptus* spp. con mayor tolerancia a bajas temperaturas, tolerando temperaturas de hasta -15°C. En contraste a *Eucalyptus globulus* Labill., una especie sensible a bajas temperaturas, pero ampliamente utilizada en la producción de celulosa en Chile, teniendo en cuenta sus características madereras, relevantes para la industria forestal y su baja tolerancia a las heladas, los programas de mejoramiento genético en *Eucalyptus* spp. han conducido a la generación de híbridos interespecíficos (*E.nitens* x *E. globulus*) que mantienen sus atributos madereros, para ser distribuidos en zonas de heladas frecuentes, sin embargo, los esfuerzos de reproducción están limitados por el conocimiento insuficiente de las bases moleculares de rasgos importantes, como por ejemplo la tolerancia al frío. Los factores de transcripción de MYB se han reportado como elementos claves en la respuesta al frío, especialmente las proteínas de tipo MYB-R2R3 involucradas en la biosíntesis de flavonoides como AtMYB12 y AtMYB111 en *Arabidopsis thaliana*. Con el objetivo de explorar el mecanismo de aclimatación a frío, se utilizó el ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *E. nitens* mediante RNA-seq, bajo un perfil de aclimatación al frío, se re-ensambló y se identificaron 20 factores de transcripción MYB-R2R3. Mediante análisis *in silico*, se seleccionaron los genes de mayor expresión *EucniMYB64* y *EucniMYB68*, homólogos a *AtMYB12* y *AtMYB111* respectivamente, para ser evaluados en el tratamiento de aclimatación a frío mediante qRT-PCR en muestras de ADNc desde tres especies de *Eucalyptus* spp.: a) *E.nitens*, genotipo tolerante al frío, b) híbrido (*E. nitens* x *E.globulus*) tolerante a frío y c) un genotipo sensible a frío de *E. globulus*. La dinámica de expresión varió entre *E. nitens* y el híbrido tolerante al frío versus *E. globulus*. Ambos genes MYB aumentaron su expresión al tratamiento a frío, y la expresión fue significativa para *MYB64* en los dos genotipos tolerantes al frío, lo que reveló una respuesta de este MYB-R2R3 en la aclimatación al frío en *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT

Eucalyptus nitens (Deane & Maiden) Maiden. is a species of the genus *Eucalyptus* spp. with greater tolerance to low temperatures, tolerating temperatures of up to -15°C, in contrast to *Eucalyptus globulus* Labill., a species that is sensitive to low temperatures, but an important importance for the production of cellulose in Chile. Considering its excellent characteristics of wood, reproduction programs in Chile have led to the generation of interspecific hybrids (*E.nitens* x *E.globulus*) that these characteristics and that you must tolerate to be distributed in areas where frost is more frequent, however, reproduction efforts are limited by insufficient knowledge of the molecular basis of important traits, such as cold tolerance. The MYB transcription factors have been reported as key elements in the response to cold, especially the proteins MYB-R2R3 involved in the biosynthesis of flavonoids such as AtMYB12 and AtMYB111 in *Arabidopsis thaliana*. In order to generate the bases in the cold regulation mechanism. *De novo* assembly of the transcriptome of *E. nitens* was performed by RNA-seq under cold acclimation profile, this assembly was used. Elimination was realized with bioinformatics tools, in this transcriptome of *E.nitens* twenty R2R3-MYB transcription factors were identified. By *in silico* analysis, *EucniMYB64* and *EucniMYB68* were selected, with identity to *AtMYB12* and *AtMYB111* respectively. Their expression was evaluated in the cold acclimation treatment, by qRT-PCR in cDNA samples of three species of *Eucalyptus* spp., *E. nitens*, genotype tolerant to cold, hybrid (*E. nitens* x *E.globulus*) cold tolerant and *E. globulus* cold-sensitive genotype. The expression dynamics varied between *E. nitens* and the cold tolerant hybrid versus *E. globulus*, both MYB genes increased their expression to cold, and it was significant for *MYB64* in the two cold tolerant genotypes, this revealed the response of this R2R3-MYB in the cold acclimation.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Industria forestal y generalidades de *Eucalyptus spp.*

La industria forestal en Chile representa uno de los sectores de mayor importancia para la economía del país, aportando un 2,69% del PIB (INFOR 2018). Las plantaciones forestales abarcan cerca de 2,4 millones de hectáreas, concentradas principalmente en la región del BíoBío, predominando el uso de las especies *Pinus radiata* D. Don, *Eucalyptus globulus* Labill y *Eucalyptus nitens*, estas dos últimas pertenecen a la familia *Myrtaceae* del género *Eucalyptus spp.* el cual comprende especies leñosas dicotiledóneas de rápido crecimiento, con una gran versatilidad adaptativa y cuya distribución natural abarca zonas de clima costero a montañoso, desde zonas que presentan alta tasa de precipitación a zonas semi-áridas, presentando una alta plasticidad fenotípica (Grattapaglia et al. 2012). En Chile representan el 34% del total de hectáreas plantadas, cuyo principal destino comercial es la pulpa de madera para la industria de celulosa y también la producción de astillas para calefacción (INFOR 2017).

Las propiedades madereras de *E. globulus* es considerada una de las mejores en base a: 1) las características de pulpa, 2) la calidad de la fibra corta para la elaboración de papeles de escritura de alta calidad, y c) el bajo contenido de lignina, lo que conlleva a un alto rendimiento en la extracción de celulosa, por lo que la delignificación, el refinado y el blanqueo, requieren bajo consumo de productos químicos (Igartúa y Monteoliva, 2010). No obstante, esta especie presenta una alta sensibilidad a bajas temperaturas debido a que en su ambiente natural, el sureste de Australia, se desarrolla bajo un clima predominantemente templado, en consecuencia su distribución geográfica en zonas frías y/o propensas a heladas se ve afectada (Guzmán 2009).

1.2 *E. nitens*, especie tolerante a frío

Una gran limitante para la distribución geográfica de plantaciones forestales, y también de otros cultivos, son las temperaturas de congelación, ya que continuamente se relacionan con la pérdida de productividad (Thomashow 1999). Como alternativa de plantación en lugares con presencia de bajas temperaturas se introdujo en Chile el 1967 *E. nitens*, a través de un programa de introducción de especies forestales del Instituto Forestal (INFOR). La especie proveniente desde Australia en donde se desarrolla en zonas propensas a heladas. Los primeros ensayos fueron en la Región de O'Higgins, hoy en día se ha demostrado como el crecimiento anual de esta especie en la costa de la Región del Biobío, en ensayos de 15 años de edad, registra un crecimiento anual promedio de 77m³/há/año. En el mismo lugar, el *E. globulus* registra 44 m³/há/año y el *Pinus radiata*, 34 m³/há/año (LIGNUM 2018). Bajo este contexto ambas especies *E. globulus* y *E. nitens* han sido estudiadas con objeto de encontrar genotipos con características comerciales óptimas, es decir, aptos para plantaciones en altitud y zonas frías, de rápido crecimiento y con buena calidad maderera, de acuerdo a los requerimientos de la industria (Tibbits y Hodge 2003). Sin embargo, el mecanismo por el cual *E. nitens* tolera temperaturas de hasta -15°C y hasta 150 heladas anuales no está dilucidado (García et al. 2000).

1.3 Mecanismo en plantas de respuesta a estrés por baja temperatura

Las plantas son organismos sésiles y se encuentran frecuentemente expuestas a un estrés ambiental variable que afecta negativamente el crecimiento y la producción. El daño por bajas temperaturas puede diferenciarse en dos tipos; por enfriamiento y congelación. En el primer caso se refiere a la exposición a una condición de frío (<20 °C), repentina que puede generar decoloraciones o lesiones foliares y retardo en el crecimiento, a nivel celular es posible observar una alteración funcional de la membrana plasmática, reducción de la respiración celular y fotosíntesis, al igual que una disminución en el transporte de carbohidratos. Por otro lado, cuando las temperaturas de exposición son menores

a los cero grados Celsius, y por un tiempo prolongado, se habla de daño por congelamiento, en el cual se expone la célula a la formación de hielo intercelular en primera instancia, generando cristales a nivel de xilema, el cual posteriormente provocará deshidratación de la célula por el traspaso de agua a nivel extracelular; y, finalmente, congelación intracelular y muerte celular (Taiz y Zeiger 2006).

Muchas especies de *Eucalyptus* spp. tienen el potencial de aumentar su tolerancia a la congelación después de una exposición previa a temperaturas frías (>0°C) (Keller et al. 2009, Keller et al. 2013, Liu et al. 2014, Germishuizen et al. 2015, Swain et al. 2015, Aguayo et al. 2016, Gaete-Loyola et al. 2017), proceso conocido como aclimatación (Chinnusamy et al. 2010), proceso que desencadena a nivel molecular la inducción de un conjunto específico de proteínas en respuesta a la baja temperatura, lo que ayuda a las plantas a hacer frente al enfriamiento y al estrés por congelación (Thomashow 1999). Dentro los procesos biológicos y mecanismos de protección frente al estrés por bajas temperaturas, se encuentran; aumento en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), balance hídrico, acumulación de solutos compatibles, alteración de la composición, estructura y función de la membrana plasmática, síntesis de moléculas crioprotectoras, además de cambios en la expresión génica a bajas temperaturas (Hannah et al. 2005, Wang et al. 2013), los cuales contribuyen en una mayor tolerancia al congelamiento (Liu et al. 2014). Por tanto la capacidad para aclimatarse al frío es un rasgo cuantitativo que comprende una reprogramación transcripcional inducida por bajas temperaturas, conduce a varias alteraciones bioquímicas y fisiológicas de la planta, lo que implica la acción de muchos genes con pequeños efectos aditivos (Heino y Palva 2004).

Los principales sensores reportados incluyen canales de afluencia de Ca^{2+} , quinasas y receptores asociados con proteínas G. Se ha considerado la membrana plasmática como un sitio para la percepción del cambio de temperatura, debido a su papel básico en la separación de lo interno del entorno externo. Por lo que una variedad de vías de señalización se activan, incluidos los mensajeros secundarios, ROS, proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPK), activadas por mitógenos cascadas de proteína quinasa (MAPK) y la activación de los

factores de transcripción (FTs), todos los cuales promueven la producción de proteínas sensibles al frío. Estos productos se puede dividir en dos grupos distintos: a) proteínas reguladoras controlando la transducción de la señal de estrés frío, y b) proteínas funcionalmente involucradas en la respuesta de tolerancia, estos últimos incluyen proteínas LEA, proteínas anticongelantes, proteínas de unión a ARNm, chaperonas, enzimas de desintoxicación, inhibidores de proteinasas, transportadores, proteínas y enzimas de transferencia de lípidos requeridas para biosíntesis osmoprotectora (Janská et al. 2010)

1.4 Factores de transcripción asociados a la respuesta a estrés por baja temperatura

La respuesta de la planta a diversos tipos de estrés abiótico, particularmente el estrés abiótico, alta salinidad del suelo, sequía, alta y baja temperatura implican cambios rápidos y coordinados a nivel transcripcional del genoma. Los estudios moleculares relacionados a la aclimatación al frío en *Eucalyptus* spp abarcan diversos tipos de análisis tales como: 1) descripción y anotación funcional de genes y bibliotecas de expresión asociados a la tolerancia al frío (Rasmussen-Poblete et al. 2008, Keller et al. 2009, Keller et al. 2013, Liu et al. 2014, Fernández et al. 2015), 2) mapeo asociativo y estudios filogenéticos comparativos para factores de transcripción implicados en la regulación al estrés por bajas temperaturas (Cao et al. 2015) y análisis transcripcional comparativo por grupos funcionales de respuesta a frío (Liu et al. 2014). Reportándose en base a los dominios de unión al ADN, los genes de varios factores de transcripción (FT) que durante la transducción de la señal, regulan directamente la expresión de los genes asociados al actuar como interruptores moleculares, interactuando específicamente con los elementos *cis* ubicados en la región promotora de los genes que regulan. En plantas, una gran proporción de genes en el genoma (aproximadamente un 10%) codifican potencialmente este tipo de proteínas (Franco-Zorrilla et al., 2014). En *Arabidopsis thaliana*, casi el 6% del proteoma codifica FT (Rayko et al., 2010). Estudios han demostrado desde diferentes

familias de factores de transcripción su rol en la regulación de la tolerancia al estrés abiótico en las plantas, incluyendo AP2 / ERF, CBF, bZIP, Zn-finger, NAC, MYB y WRKY en la regulación de la tolerancia al estrés abiótico en las plantas. Principalmente los elementos que responden a ABA (ácido abscísico), fitohormona que desarrolla un papel crucial en la respuesta adaptativa a estrés biótico y abiótico (Cutler et al. 2010), se han relacionado a la respuesta a estrés por baja temperatura, modulando los factores de transcripción MYB (Agarwal et al. 2006, Chinnusamy et al. 2007, Lippold et al. 2009, Wang et al. 2017, An et al. 2018, D'Amelia et al. 2018).

1.5 Factores de transcripción MYB

La familia MYB representa una clase de proteínas funcionalmente diversas, que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino eucariota. Desde el hallazgo inicial del primer gen MYB en plantas, *Zea mays* (Ares et al. 1987) se han reportado más de 200 tipos de MYB en plantas (Arratia y Aguirre 2013). En general, la mayoría de las proteínas MYB funcionan como factores de transcripción y se caracterizan por la presencia de números variables de repeticiones del dominio MYB conservado en el extremo N-terminal, asociadas principalmente con interacciones de unión a ADN e interacciones proteína-proteína (Dubos et al. 2010). Utilizándose el número de repeticiones del dominio en la secuencia como criterio de clasificación para las proteínas de la familia MYB. Por lo tanto, en función del número de dominios MYB, se han clasificado en cuatro grupos diferentes, como las proteínas 1R-, R2R3-, 3R- y 4RMYB, respectivamente (Figura 1), cada repetición generalmente comprende aproximadamente 52 residuos de aminoácidos, formando tres hélices alfa, la segunda y la tercera hélice en cada repetición están involucradas en la formación de un motivo del tipo hélice-giro-hélice (HTH) con tres residuos de triptófano espaciados regularmente, produciendo un núcleo hidrofóbico en la estructura HTH tridimensional (Ogata et al. 1996). En las plantas, la mayoría de las proteínas MYB codifican la clase R2R3-MYB, que se cree que evolucionaron a partir de un ancestro del gen R1R2R3-MYB, por la pérdida de las secuencias que codifican la repetición R1 y la

subsiguiente expansión de la familia de genes (Rosinski et al.1998). Sin embargo, también se ha propuesto la evolución de los genes 3R-MYB de los genes R2R3-MYB por la ganancia de las secuencias que codifican la repetición R1 a través de una antigua duplicación intragénica (Jiang et al. 2004). Los factores de transcripción R2R3-MYB tienen una estructura modular, con un dominio de unión al ADN en la región N-terminal (el dominio MYB) y un dominio de activación o represión generalmente ubicado en el la región C-terminal. En contraste con el dominio MYB es altamente conservado, mientras las otras regiones de las proteínas R2R3-MYB son altamente variables. Sobre la base de la conservación del dominio de unión al ADN y de los motivos de aminoácidos en los dominios C-terminal (Stracke et al.2001). Implicadas en la regulación de respuestas múltiples, tales como estrés biótico y abiótico, señalización de la hormona (Segarra et al.2009) , biosíntesis de fenilpropanoides, determinación de la forma de la célula y regulación de la diferenciación (Xie et al.2010).

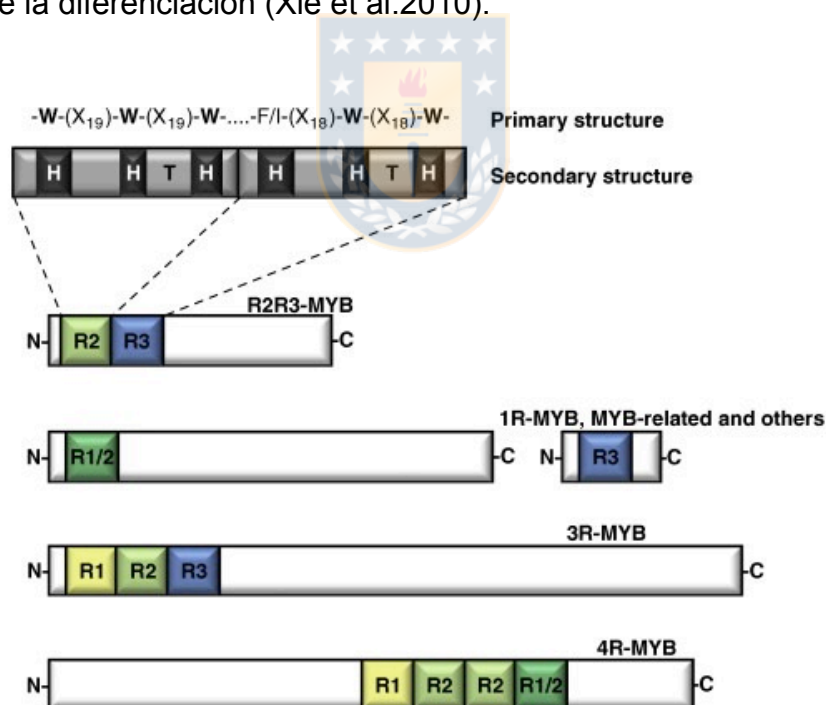


Figura 1. Clasificación de las proteínas MYB. Los bloques representan las posibles repeticiones del dominio en los factores de transcripción MYB, Fuente: Dubo et al. 2010.

1.6 Antecedentes del rol de factores de transcripción MYB-R2R3 en respuesta a estrés por baja temperatura

En general los factores de transcripción MYB involucrados en respuesta a estrés abiótico por baja temperatura responden a ácido abscísico (ABA) reconociendo un elemento en *cis* conservado, denominado elemento *ABA-responsive* en sus genes target (ABRE, PyACGTGG / TC) (Busk y Pagès, 1998). Hoy en día las revisiones sistemáticas de mutaciones *knockout* en genes MYB, seguidas por análisis fenotípicos y el diseño de mutantes han comenzado a desentrañar las funciones de los 125 genes R2R3-MYB en *A.thaliana* y en otras especies. En *Oryza sativa* se han reportado que la sobreexpresión de OsMYB4 confiere tolerancia significativa al estrés por frío y al estrés por congelación en líneas de *A. thaliana* transgénica (Pasquali et al. , 2008). El gen de *O.sativa* MYB tipo R2R3, *OsMYB2*, se ha caracterizado funcionalmente por su rol en la tolerancia al estrés abiótico mediante la generación de plantas de arroz transgénico con sobreexpresión e interferencia de ARN de *OsMYB2*. El mutante que sobreexpresó *OsMYB2*. aumentó la tolerancia a estrés salino, frío y deshidratación por sobre las líneas silvestres. Además las plantas que sobreexpresaron *OsMYB2* acumularon cantidades mayores de azúcares solubles y prolina que las plantas *wildtype* bajo estrés salino. Por otra parte, la sobreexpresión de *OsMYB2* de estas causó que se acumularan menos cantidades de peróxido de hidrógeno y malondialdehído, aumentando la actividad de enzimas antioxidantes, como la peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa (Yang et al.2012). El factor de transcripción AtMYB12 de *A.thaliana* tipo R2R3 ha sido reportado como activador específico de la biosíntesis de flavonoides, activando los promotores de genes diana que codifican las enzimas de la ruta, chalcona sintasa, chalcona isomerasa y flavonol sintasa, reportando que la sobreexpresión de MYB12 posee un estrecho vínculo estrecho entre el nivel de expresión de MYB12 y el contenido de flavonol de plántulas jóvenes (Mehrtens et al. 2005). Además, se ha validado el papel funcional de los flavonoides en la tolerancia a frío (4°C), y la participación en la acumulación de estos compuesto bajo la expresión MYB12 y MYB 111, se ha

presentado un análisis exhaustivo utilizando qRT-PCR para la transcripción y análisis de expresión, LC-MS para flavonoides y GC-MS para mediciones de metabolitos primarios, y un análisis de electrolitos para determinar la tolerancia a la congelación en mutantes de *A.thaliana*, con acumulación predominante de compuestos de quercetina y antocianina con respecto a las mutantes que expresaban los factores de transcripción MYB12 y MYB111 con tolerancia a congelación (Schulz et al.2016). Se ha reportado que la activación de la vía de biosíntesis de flavonoides donde participa MYB 12, se realiza mediante la interacción con algunos factores de transcripción el tipo bHLH3 y bHLH33 (Wang et al.2017).

1.7 Estudios transcripcionales en *E.nitens* en respuesta a baja temperatura

El año 2017 se publicó el transcriptoma de *E. nitens* guiado por referencia con *E. grandis* bajo el perfil de aclimatación a baja temperatura con el fin de obtener una visión más profunda de los mecanismos moleculares que participan en la respuesta a frío (Gaete-Loyola et al.2017), se utilizó el transcriptoma bajo el perfil de aclimatación a baja temperatura por RNA-Seq, utilizando la herramienta de secuenciación Ion Torrent (Life Technologies) considerada como una tecnología *post-light*, ya que no depende de la de la emisión de luz para detectar la incorporación de nucleótidos, basada en la tecnología de semiconductores, utiliza chips con sensores de voltaje en cada pocillo capaces de detectar los protones (H⁺) liberados cada vez que un nucleótido se une a la nueva cadena en formación (Loman et al. 2012), por lo tanto por cada nucleótido que se añade a la hebra ocurre una hidrólisis del grupo trifosfato, lo cual causa la liberación del protón que genera el cambio de pH. El estudio se realizó en plantas de medios hermanos de *E. nitens*, utilizando como material el tejido foliar de las plantas, las bibliotecas de secuenciación fueron generadas por condición; control no aclimatado (NA), aclimatados antes de la helada (AAH), aclimatados después de la helada (ADH) y condición de desaclimatación (DA), el transcriptoma fue ensamblado por referencia con el genoma depositado de *E. grandis* permitiendo a través del

análisis de expresión diferencial la identificación de un total de 1600 DEG (genes expresados diferencialmente) de los cuales 1088 y 1071 se identificaron en respuesta a la aclimatación en frío y la desaclimatación, respectivamente, el análisis de las vías bioquímicas reveló un gran número de DEG representados en la biosíntesis de fenilpropanoides, que sugiere un papel en la regulación de la síntesis de ABA, hormona que ha estado implicada en numerosas rutas de estrés abiótico, entre ellos, frío. El reporte señaló un total de 115 DEG correspondientes a factores de transcripción, siendo las familias más representadas AP2, WRKY y MYB. Posteriormente se realizó el ensamble *de novo* del transcriptoma de *E. nitens*, el que presentó *contigs* con alta identidad con algunos factores de transcripción MYB reportados en *E. grandis* (Lagos 2015), dentro de ellos MYB64 de *E. grandis* (Eucgr.D02390) MYB-R2R3 con identidad con *AtMYB12* de *A. thaliana*, factor de transcripción que ha sido reportado su respuesta a bajas temperaturas. El transcriptoma fue generado en el Laboratorio de Genómica Forestal, Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción y fue dispuesto para esta investigación. Mediante herramientas bioinformáticas se eliminó redundancia y se re-ensambló el transcriptoma, para luego anotar y caracterizar los factores de transcripción MYB-R2R3, con las secuencias reportadas en *E. grandis*, especie cercana filogenéticamente con el genoma depositado y en la que se ha realizado la anotación de todos los factores de transcripción MYB-R2R3 presentes en el genoma (Soler et al. 2015). Se evaluó *in-silico* la acumulación de transcritos de MYB-R2R3 en el perfil de aclimatación a baja temperatura de *E. nitens*. Finalmente, se evaluó la acumulación de transcritos de los genes seleccionados en respuesta a frío *in silico* por qRT-PCR, en muestras de ADNc de *E. nitens*, híbrido *E. nitens* x *E. globulus* (tolerante a frío) y *E. globulus* (sensible a bajas temperaturas).

2 HIPÓTESIS

MYB64 es el factor de transcripción MYB-R2R3 con mayor abundancia de transcritos en el transcriptoma *de novo* de *Eucalyptus nitens* en respuesta a baja temperatura y esta abundancia de transcritos es mayor en *E. nitens* cuando se compara con otras especies de *Eucalyptus* spp. en la aclimatación a frío.

3 OBJETIVOS

Para responder a esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos, general y específicos:

3.1 Objetivo general

Evaluar la abundancia de transcritos de los factores de transcripción MYB-R2R3 presentes en el transcriptoma *de novo* en respuesta a baja temperatura de *E. nitens* y comparar su expresión relativa con otras especies de *Eucalyptus* spp.

3.2 Objetivo específicos

- Establecer la identidad de secuencias en el transcriptoma *de novo* de *E. nitens* con los factores de transcripción MYB-R2R3 reportados en *E. grandis*.
- Evaluar la expresión diferencial *in silico* de los factores de transcripción MYB-R2R3 de *E. nitens* en el perfil de aclimatación a baja temperatura.
- Evaluar la expresión relativa de los genes seleccionados por qRT-PCR en la aclimatación a frío en *Eucalyptus* spp.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material disponible

Se utilizaron los datos del transcriptoma de *E.nitens* desarrollado por Lagos 2015, Genómica Forestal S.A, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Los datos de secuenciación corresponden al análisis de expresión realizado con la técnica Ion Torrent desde muestras de tejido foliar, de cuatro familia de medios hermanos sometidas a un perfil de aclimatación, descrito por Fernández et al. (2010) bajo cuatro condiciones (Figura 2). La condición control no aclimatado (NA) consistió en someter a las plantas a un fotoperíodo de 14 horas de luz con una temperatura de 20/12 °C (día/noche) durante nueve días. El día diez fueron sometidos a la condición de frío aclimatado antes de las heladas (AAH) durante ocho días con un fotoperíodo corto de 10 horas y a una temperatura de 8/4 ° C (día/noche). Posteriormente, durante cuatro noches, se simularon heladas nocturnas de -2°C, con una disminución de 2°C por hora, correspondiente al tercer tratamiento de frío aclimatado después de las heladas (ADH). Para la última condición, desaclimatado (DA), se utilizó un fotoperíodo de 14 horas de luz y una temperatura de 12/4 ° C (día/noche) durante ocho días. En cada punto del perfil de aclimatación, se recolectó el tejido foliar de tres plantas por condición para el análisis de RNA-Seq y qRT-PCR. (Figura 2).

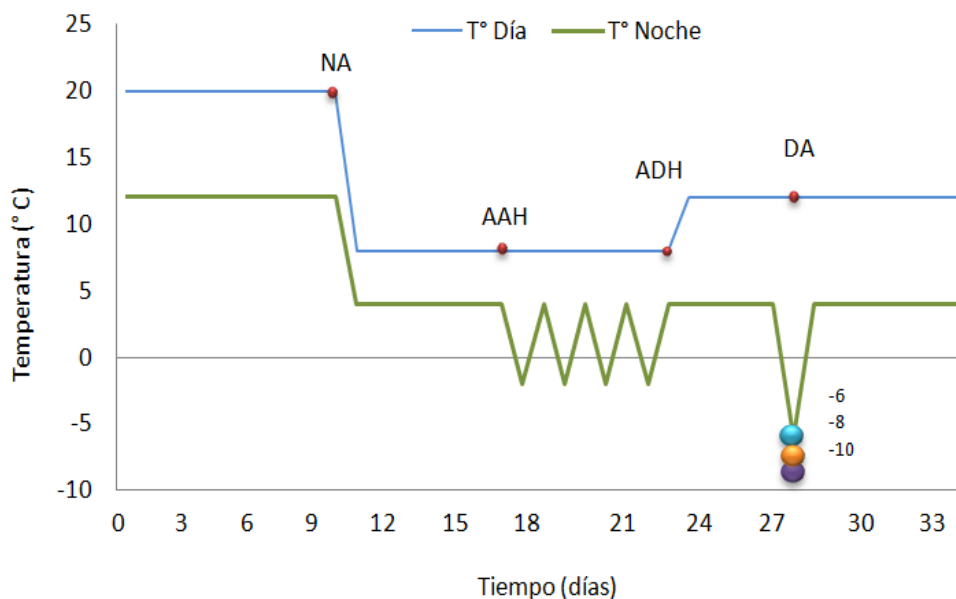


Figura 2. Perfil de aclimatación a frío con cuatro condiciones.

NA (no aclimatado), AAH (aclimatado antes de helada), ADH (aclimatado después de helada) y DA (desaclimatado) (Fernández et al. 2010, modificado). Las temperaturas -6,-8 y -10°C fueron aplicadas al término del perfil de aclimatación correspondientes a ensayos de daño y supervivencia. Fuente: Lagos 2015.

4.2 Reensamble del transcriptoma de *E.nitens*

Se realizó el re-ensamble del transcriptoma de *E.nitens* generado por Lagos (2015) con la herramienta MIRA4, el cuál presentaba un total de 2.181.752 *contigs* y un tamaño medio de *contigs* de 236 pb. Los *contigs* se agruparon utilizando el programa CD-HIT-EST versión 0.4.7 (Li y Godzik, 2006) para la eliminación de redundancia (umbral de agrupación de 90% de identidad). Los *contigs* fueron reensamblados por CAP3 (Huang 1999), software que tiene la capacidad de eliminar regiones de lectura de baja calidad en las regiones 5' y 3', utilizando un algoritmo que otorga valores de calidad base en el cálculo de superposiciones entre lecturas y también utiliza restricciones de avance-retroceso para corregir errores de ensamblaje y vincular *contigs* (Huang et al. 1999), por lo que fue

utilizado con la finalidad de eliminar redundancia y generar *contigs* de mayor tamaño, además se utilizó un filtro de tamaño de secuencia de 300 pb equivalentes a ~50 aminoácidos desde dos repeticiones continuas de dominios MYB. El re-ensamble se realizó utilizando una estación de trabajo Exxact de 40 núcleos y 500 Gb de memoria RAM perteneciente al Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Farmacología, Universidad de Concepción. Las métricas del nuevo transcriptoma fueron obtenidas utilizando Prinseq-lite v0.20.3.

4.3 Establecer la identidad de los factores de transcripción MYB de *E. nitens* con los presentes el genoma de *E. grandis*

Para la identificación de los factores de transcripción MYB en *E. nitens*, se construyó una base de datos de los factores de transcripción MYB reportados en *E. grandis* utilizando las bases de datos; Plant Transcription Factor DataBase (PInTFDB), en su versión 4.0. (Jing et al. 2017), Phytozome (<https://phytozome.jgi.de.gov>) y la anotación de los factores de transcripción MYB R2R3 de *E. grandis* realizado por Soler et al. (2015). Fueron utilizadas dos estrategias para la identificación de los factores de transcripción MYB en el transcriptoma de *E. nitens*, en primer lugar se utilizó la herramienta BLAST v2.2.3 (Altschul et al. 1997) ingresando como secuencia consulta el transcriptoma de *E. nitens*, el que fue comparado con la base de datos local de los factores de transcripción MYB de *E. grandis*, realizada con la herramienta makeblastdb disponible en BLAST 2.2.31+, que produce bases de datos compatibles con BLAST a partir de archivos FASTA (Tatusova et al. 1999), las bases de datos fueron nucleotídicas para el BLASTn considerando el parámetro de identidad con un valor >90% (Gao et al. 2005) y peptídicas para el BLASTx utilizando como parámetro de identidad un valor >40% (Feike et al. 2012) en ambos casos se considero una cobertura mayor al 30% y un e-value $\leq e-10$ (Donofrio et al. 2006). La segunda estrategia para la identificación de los factores de transcripción MYB de *E. nitens* y con el propósito de obtener la región codificante (cds) de los transcritos identificados por BLAST se realizó un mapeo guiado por referencia

utilizando el programa Burrows-Wheeler Aligner (BWA), software utilizado para mapear secuencias poco divergentes frente a genomas de referencia de gran tamaño disponible. El programa consiste en tres algoritmos: BWA-backtrack, BWA-SW y BWA-MEM. El primer algoritmo está diseñado para lecturas de secuencia de larga longitud, BWA-MEM y BWA-SW comparten características similares, como soporte de lectura prolongada y alineación de división, pero BWA-MEM tiene un mejor rendimiento que BWA-backtrack para lecturas de hasta 100pb, tamaño de secuencia presentes en las bibliotecas generadas por condición para *E.nitens* siendo seleccionado éste último para el análisis de los datos. Los transcritos de los factores de transcripción MYB de *E.grandis* fueron utilizados como referencia y se alinearon con las secuencias de las 12 bibliotecas de *E.nitens*, tres por condición (NA,AAH,ADH,DA). Para el mapeo se utilizaron parámetros por defecto y el formato FASTA para las secuencias. Para la salida del análisis se utilizó el formato SAM, el cual permite almacenar alineamientos en relación a una referencia y ha sido adoptado por la mayoría de los programas que realizan alineamientos. El archivo SAM fue procesado con el programa SAMtools el cual convierte archivos SAM en BAM con un formato binario de SAM (Li et al. 2009), para posteriormente ser visualizado en el software Integrative Gene View (IGV) (Thorvaldsdóttir et al. 2013).

Se obtuvo el marco de lectura con la herramienta BLASTx para los *contigs* con identidad contra los factores de transcripción MYB, estas secuencias fueron traducidas en la herramienta EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq), con el fin de obtener las secuencias de aminoácidos. Para el análisis de secuencias peptídicas y la predicción de la presencia de dominios MYB-R2R3 se utilizó el programa Prosite (<https://prosite.expasy.org/>). La predicción de la estructura secundaria de los factores de transcripción MYB-R2R3 de *E.nitens* se realizó con el programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), finalmente se utilizó el programa RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>), que es un servidor de predicción de estructura 3D de proteínas entregando un modelo de la proteína en formato PDB, que posteriormente fue visualizado en PyMOL v2.2.

4.4 Evaluación de la expresión diferencial *in silico* de los factores de transcripción MYB-R2R3 de *E.nitens* en el perfil de aclimatación a baja temperatura

Las lecturas de secuenciación obtenidas para cada condición (NA, AAH, ADH y DA) se alinearon utilizando la herramienta Bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012) contra el transcriptoma de referencia ensamblado de *E.nitens* anotado con el genoma de *E.grandis*. El número de lecturas asignadas a cada secuencia del transcriptoma se obtuvo con la herramienta idxstats de samtools (Trapnell et al. 2012). Las bibliotecas se normalizaron utilizando el método TMM (Trimmed Mean of M-values), que calcula el tamaño efectivo de cada muestra (Soneson et al. 2013) y se generaron gráficos de escalamiento multidimensional (MDS) para mostrar la relación entre las muestras y eliminar los valores atípicos, las distancias entre las bibliotecas corresponden al coeficiente de variación biológica (BCV) (Robinson et al 2010). La normalización por el cálculo de CPM (conteos por millón) utiliza los tamaños de biblioteca efectivos calculados por la estandarización de TMM, y se calcula para cada gen (Maza 2016). Los genes con niveles de expresión promedio en todas las muestras de 2 CPM se consideraron para el análisis. El análisis de expresión *in silico* se realizó utilizando el paquete edgeR, desde bioconductor (<http://bioconductor.org/>), sobre la plataforma de trabajo de R studio v.2.0.3 (Robinson et al. 2010), edgeR utiliza un modelo basado en la distribución binomial negativa para identificar los genes que se expresan diferencialmente y ha sido utilizado para experimentos de RNA-Seq, Tag-Seq y SAGE que utilizan principalmente réplicas biológicas (Tao et al. 2012). Para seleccionar genes expresados diferencialmente (DEG), se utilizó un logFC mayor que 2 (positivo para *upregulated* y negativo para *downregulated*), para la significancia se utilizó el valor $p < 0.05$ y una tasa de detección de falsos positivos (FDR) < 0.05 (Gaete-Loyola et al. 2017).

4.5 Evaluación por qRT-PCR de los factores de transcripción seleccionados en respuesta a frío en *Eucalyptus* spp.

Se utilizaron muestras de ADNc disponibles en el Laboratorio de Genómica Forestal del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, provenientes del tejido foliar de una familia de *E. nitens*, las cuales fueron muestras utilizadas por Lagos 2015 en el estudio de aclimatación a frío. Además, se utilizaron muestras de ADNc disponibles de un genotipo de *E. globulus* sensible a bajas temperaturas, sometido al mismo perfil de aclimatación a frío (Proyecto CORFO 05- CTE-04-03) y de un híbrido *E.nitens*x *E.globulus* genotipo resistente a frío sometido a las mismas condiciones de aclimatación a frío. Por lo que las muestras de ADNc de estos tres genotipos fueron dispuestas para este ensayo. Los transcriptomas disponibles de *E.gobulus* y el híbrido se utilizaron obtener las secuencias de *MYB64* y *MYB68*, utilizando la herramienta BLAST. Los partidores de los genes seleccionados se diseñaron utilizando el programa Primer3 versión 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>) (Tabla 1), considerando parámetros para qRT-PCR ($T_m=60$ °C, 40-60% contenido GC, tamaño amplicón 75-150 pb). Se evaluó la especificidad de los partidores mediante el software Primerblast (disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los partidores fueron evaluados en muestras de ADNg y ADNc mediante PCR de punto final, se verificó el tamaño del amplicón en gel de agarosa y luego se realizó la prueba de eficiencia mediante qRT-PCR. Se consideraron como partidores eficientes si mostraban un valor entre 90% y 100% de eficiencia. La especificidad de los amplicones fue determinada por la curva de disociación obtenida por el programa de Applied Biosystem (60-90°C) después de 40 ciclos. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

Formula 1: Cálculo de eficiencia

$$E = (10^{(-1/Pendiente)} - 1) * 100$$

Para el análisis se utilizó el equipo 7300 Real-Time System (Applied biosystems), las condiciones de PCR fueron: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos (95 °C por 10 segundos y 60 °C por un minuto), 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos, 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 15 segundos según Lagos 2015. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit Eva Green (Solis BioDyne) para generar una reacción de 20 µL por triplicado biológico y técnico de cada muestra. Los resultados de la expresión relativa se obtuvieron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando GAPDH y Eif4A como genes de referencia endógenos para *E.nitens* e híbridos *E.nitens* x *E.globulus* (Gaete-Loyola et al. 2017), para *E.globulus* se utilizaron los genes EF1 α y UBC (Fernández 2010) (Tabla 1). Las diferencias entre los valores de expresión se determinaron mediante un ANOVA de dos vías considerando el tratamiento y el genotipo, se utilizó una prueba de Tukey para identificar aquellos valores con diferencias significativas ($P < 0.05$), utilizando el software R para ambos análisis. Posteriormente se expresó el valor de expresión obtenido por qRT-PCR en valor FC en el perfil de alimentación, como el logaritmo en base dos entre el diferencial de cada comparación en el tratamiento a frío (NA-AAH, NA-ADH y AAH-ADH), con el fin de evaluar el valor de cambio entre cada punto. Finalmente, una DEG validada se consideró como verdadera-positiva cuando RNA-Seq y qRT-PCR mostraron las mismas direcciones (regulación positiva o negativa) de la expresión diferencial en valor de FC y determinada por el coeficiente de correlación de Spearman utilizando herramientas R (Team RC 2013).

Tabla 1. Partidores utilizados en qRT-PCR

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen
<i>MYB64F</i>	TCATCTTCCCAAGGCCATTA	MYB transcription factor 64
<i>MYB64R</i>	TTTCATCTGACCTGGCAACA	
<i>MYB68F</i>	AAAACCACAGCAAGGGACTG	MYB transcription factor 68
<i>MYB68R</i>	TCCTGAGGGCTCTTCTCTGA	
<i>GADPH-F</i>	GCCTTCCGTGTTCTACTGTTG	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
<i>GADPH-R</i>	ATCTCATCATAAGTTGCCGCCTTC	
<i>EiF4a-F</i>	TCTCTGCCACAATGCCACCTG	Eukaryotic initiation factor-4A
<i>EiF4a-R</i>	TCATCACGCTTCACAAGAATCCTAAC	
<i>EF1α -F</i>	CCTGTCCTTGAATTGTCACACTTCC	Elongation factor 1 α
<i>EF1α -R</i>	CCATTCCAGCATCACCGTTCTTC	
<i>UBC-F</i>	GACGGACAGGAACAAGTATGAGAC	Ubiquitin C
<i>UBC-R</i>	GACGGACAGGAACAAGTATGAGAC	

Fuente: Elaboración propia.

4.6 Análisis filogenético y asociación funcional

Para el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) se utilizó la herramienta MAFFT E-INS-i (<https://mafft.cbrc.jp>) utilizado en proteínas que presentan más de un dominio en la secuencia (Kato et al. 2013). La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo con el programa RAxML v8 utilizando el método de máxima verosimilitud según la metodología utilizada por Shukla et al. (2015) utilizando la matriz JTT basada en una matriz de sustitución de aminoácidos PAM (Gonnet et al. 1992), además, se realizó la prueba bootstrap para la reconstrucción del árbol basada en 1000 iteraciones, finalmente se visualizó y editó el árbol filogenético en iTOL (<https://itol.embl.de>). Para el estudio de las redes de interacción proteína-proteína, se utilizó la base de datos biológica STRING <https://string-db.org>, un recurso web de interacciones proteína-proteína, predicho en la especie *A. thaliana*, para las proteínas MYB seleccionados en respuesta la aclimatación a frío en *E. nitens*.



5 RESULTADOS

5.1 Reensamble de secuencias del transcriptoma de *E. nitens*

El reensamble de las secuencias del transcriptoma de *E. nitens* utilizando la herramienta CAP3 permitió disminuir la redundancia, el número de *contigs* obtenidos con MIRA4 el transcriptoma, tenía un total de 2.181.752 *contigs*, con un tamaño máximo de contig de 2.114 pb y un N50 de 248 pb. La estrategia de reensamble con un límite de tamaño mínimo de 300 pb, generó el transcriptoma global de *E. nitens* con un total de 284.261, *contigs* con una longitud media de 487 pb y un valor N50 de 473 pb (Tabla 2).

Tabla 2. Métricas de los ensambles del transcriptoma de *Eucalyptus nitens* en respuesta a aclimatación a baja temperatura. Los valores fueron calculados con la herramienta stats de Prinseq-lite v0.20.3.

Métricas	Ensamble MIRA4	Re-ensamble
Tamaño máx. de <i>contigs</i> (pb)	2114	2249
Tamaño medio de <i>contigs</i> (pb)	236	430
N50	248	419
Nº de pares de bases	515.213.830	186.483.28
Nº de <i>contigs</i>	2.181.751	433.159
Media GC (%)	45.8	46

Fuente: Elaboración propia.

5.2 Identidad de los transcritos de *E. nitens* con los factores de transcripción MYB anotados en *E. grandis*

Se construyó la biblioteca local de proteínas MYB, esta alojó la información de todos los factores de transcripción MYB disponibles de *E. grandis*, 142 MYB R2R3 (Anexo 1). Mediante la herramienta BLAST se logró identificar 111 *contigs* con alta identidad con los factores de transcripción MYB de *E. grandis*, 32 secuencias representaron unigenes. Según predicción del dominio MYB, 17 secuencias contenían al menos un dominio MYB, de este total 14 tuvieron alta identidad con MYB tipo R2R3, dos con factores de transcripción MYB related y uno con un 3R MYB de *E. grandis* (Tabla 3).

Tabla 3. Similitud de secuencias del transcriptoma de *Eucalyptus nitens* con los factores de transcripción MYB de *Eucalyptus grandis* por BLASTn.

<i>Contigs</i> transcriptoma <i>E.nitens</i>	ID <i>E.grandis</i>	%Identidad	e-value
Contig110003	Eucgr.K02470/MYB136	99.01	6.9e-155
Contig 132316	Eucgr.I01791/MYB108	98.28	0.0
NA2F7_c33264	Eucgr.G03183/MYB92	99.28	0.0
Contig651	Eucgr.G02195/MYB89	99.30	0.0
AAH3F7_c57371	Eucgr.F04422/MYB142	99.49	0.0
NA3F7_C22984	Eucgr.F02864/MYB82	99.25	0.0
AAH2F7_c35317	Eucgr.F02583/MYB79	96.85	4.1e-165
Contig14911	Eucgr.F00002/MYB73	98.96	1.1e-145
Contig86300	Eucgr.E01031/MYB68	99.58	0.0
Contig30974	Eucgr.D02390/MYB64	98.46	0.0
Contig74313	Eucgr.C00826/MYB41	98.69	0.0
Contig97119	Eucgr.C00722/MYB37	99.11	6.6e-174
ADH1F7_c79537	Eucgr.B03417/MYB29	99.30	0.0
Contig112296	Eucgr.B02896/MYB26	99.08	0.0
Contig65025	Eucgr.C02893/3RMYB	99.49	0.0
ADH1F7_c91508	Eucgr.A01029/ MYBrelated	95.08	0.0
AAH2F7_c18193	Eucgr.J00271/ MYBrelated	98.87	0.0

Fuente: Elaboración propia.

El alineamiento de secuencias utilizando la herramienta de BWA indexando como referencia los transcritos MYB de *E. grandis*, permitió identificar secuencias que pertenecían a un transcrito MYB de *E. nitens*, pero que debido a un bajo nivel de solapamiento no permitió el ensamble de las secuencias. Para las secuencias alineadas con BWA a un transcrito MYB de *E. grandis* se utilizó como primera estrategia disminuir el *overlap* utilizando el software CAP3 a un valor de solapamiento 20 nucleótidos, aquellas que no fueron ensambladas utilizando herramientas bioinformáticas, debido a que el nivel de solapamiento era menor que el establecido, fueron concatenadas manualmente con la información de los análisis previos que respaldaban la identidad que presentaron con los transcritos MYB de *E. grandis*. De esta forma el alineamiento con BWA permitió aumentar el tamaño de los *contigs* identificados anteriormente por BLAST, para la obtención de la región codificante (Tabla 4). Por otra parte, el alineamiento con BWA permitió identificar y ensamblar seis nuevos factores de transcripción MYB del tipo R2R3 en el transcriptoma de *E.nitens* (Tabla 4).

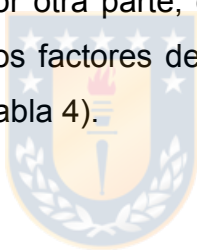


Tabla 4. Tamaño de contigs identificados. Tamaño de la secuencia obtenida con BLAST, tamaño final de transcritos concatenados al utilizar BWA y tamaño del transcrito de *Eucalyptus grandis*.

Código <i>E. grandis</i>	Tamaño transcrito <i>E. grandis</i>(pb)	Tamaño cds <i>E. grandis</i> (pb)	Tamaño secuencia <i>E. nitens</i> BLAST (pb)	Tamaño secuencia <i>E. nitens</i> +BWA (pb)
Eucgr.B02896/MYB26	1604	690	765	1254
Eucgr.B03417/MYB29	2901	1440	497	1571
Eucgr.C00722/MYB37	1300	873	589	1083
Eucgr.C00826/MYB41	1439	978	994	1604
Eucgr.D02390/MYB64	1456	894	821	1653
Eucgr.E01031/MYB68	1298	954	1022	1022
Eucgr.F00002/MYB73	1611	1020	466	712
Eucgr.F04422/MYB142	552	552	397	677
Eucgr.F02864/MYB82	1383	903	436	628
Eucgr.G02195/MYB89	1366	702	536	536
Eucgr.G03183/MYB92	2428	1680	639	962
Eucgr.I01791/MYB108	799	663	466	646
Eucgr.F02583/MYB79	1299	906	471	471
Eucgr.K02470/MYB136	1682	1044	768	1555
Eucgr.B00865/MYB19	1230	642	-	881
Eucgr.B00866/MYB20	867	588	-	765
Eucgr.B02144/MYB24	844	753	-	497
Eucgr.C02096/MYB44	1361	1137	-	589
Eucgr.H00158/MYB93	826	801	-	409
Eucgr.H04082/MYB99	1230	1206	-	473

Fuente: Elaboración propia.

Con las secuencias identificadas se realizó un BLASTx utilizando los parámetros descritos en metodología y se identificaron los marcos de lecturas para obtener la

secuencia de aminoácidos, de las secuencias que correspondieron a MYB-R2R3 (Tabla 5).

Tabla 5. Similitud de los 20 factores de transcripción MYB de *Eucalyptus nitens* con *E. grandis* por BLASTx. Repetición de dominios en la secuencia de aminoácidos según predicción en PROSITE.

MYB <i>E.nitens</i>	ID <i>E.grandis</i>	e-value	Pident (%)	Covery (%)	ORF	Dominio
MYB19	Eucgr.B00865	2.56e-116	96.31	56	1	R2
MYB20	Eucgr.B00866	6.28e-58	86.40	41	3	R2
MYB24	Eucgr.B02144	1.84e-33	90.47	35	1	-
MYB26	Eucgr.B02896	6.8e-116	99.32	36	3	R2
MYB29	Eucgr.B03417	0.0	70.26	84	2	R2
MYB37	Eucgr.C00722	1.68e-145	73.40	80	2	R2R3
MYB41	Eucgr.C00826	3.08e-123	92.63	35	3	R2R3
MYB44	Eucgr.C02096	4.57e-27	68.11	39	2	R2
MYB64	Eucgr.D02390	6.83e-165	95.55	49	2	R2R3
MYB68	Eucgr.E01031	3.02e-114	92.89	50	1	R2R3
MYB73	Eucgr.F00002	9.11e-98	95.80	59	3	R2R3
MYB79	Eucgr.F02583	8.23e-47	83.33	53	1	R2R3(parcial)
MYB82	Eucgr.F02864	1.38e-88	99.17	58	2	R2R3
MYB142	Eucgr.F04422	1.41e-114	98.91	82	3	R2R3
MYB89	Eucgr. G02195	6.54e-97	96.59	82	1	R2
MYB92	Eucgr. G03183	2.63e-60	88.88	33	1	R2
MYB93	Eucgr.H00158	5.0e-56	98.00	66	2	R2
MYB99	Eucgr.H04082	3.0e-44	99.00	46	3	R2R3
MYB108	Eucgr.I01791	5.63e-127	98.25	80	2	R2R3
MYB136	Eucgr.K02470	0.0	98.84	67	2	R2R3

Fuente: Elaboración propia.

A través del análisis de predicción del dominio por PROSITE y PSIPRED, los resultados mostraron que de las 20 secuencias R2R3 identificadas, 10 contenían el dominio MYB R2R3 (Tabla 6), diez del total contenían la secuencia completa del dominio, excepto EucniMYB79 (Anexo 2 y 3).

Tabla 6. Similitud por BLASTx de los 10 factores de transcripción MYB-R2R3 de *Eucalyptus nitens* con dominio predicho. Los factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* utilizando la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>).

MYB <i>E.nitens</i>	ID <i>E.grandis</i> * ¹	e-value	pident (%)	ID <i>A.thaliana</i> * ²	MYB <i>A.thaliana</i>
MYB37	Eucgr.C00722.1	1.68e-145	73.401	AT2G16720.1	AtMYB7
MYB41	Eucgr.C00826.1	3.08e-123	92.632	AT1G22640.1	AtMYB3
MYB64	Eucgr.D02390.1	6.83e-165	95.556	AT2G47460.1	AtMYB12
MYB68	Eucgr.E01031.1	3.02e-114	92.889	AT5G49330.1	AtMYB111
MYB73	Eucgr.F00002.1	9.11e-98	95.804	AT5G67300.1	AtMYB44
MYB82	Eucgr.F02864.1	1.38e-88	99.174	AT1G66230.1	AtMYB20
MYB142	Eucgr.F04422.1	1.41e-114	98.913	AT5G14750.1	AtMYB66
MYB99	Eucgr.H04082.1	3.0e-44	99.000	AT1G48000.1	AtMYB112
MYB108	Eucgr.I01791.1	5.63e-127	98.256	AT5G40330.1	AtMYB23
MYB136	Eucgr.K02470.1	0.0	98.847	AT3G47600.1	AtMYB94

*¹ ID *E.grandis* in Phytozome: <https://phytozome.jgi.doe.gov>, *² ID *A.thaliana* in TAIR: <https://www.arabidopsis.org>.

Fuente: Elaboración propia.

Para identificar la conservación del dominio MYB se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de los diez factores de transcripción que contenían el dominio R2R3 de *E.nitens*, con los factores de transcripción con identidad por GO en *A. thaliana*, y se comparó con el MYB-R2R3 de *Mus musculus* Mmc-MYB (número de accesoión, GenBank NP_034978) especie lejana filogeneticamente. El alineamiento confirmó en función de la presencia de aminoácidos de triptófano conservados y espaciados regularmente en el dominio R2 y R3, la alta conservación del dominio, e identificó las dos regiones de repetición imperfecta de 50 aminoácidos típicas para cada dominio MYB, con una similitud de secuencia del 94% (Figura 3).



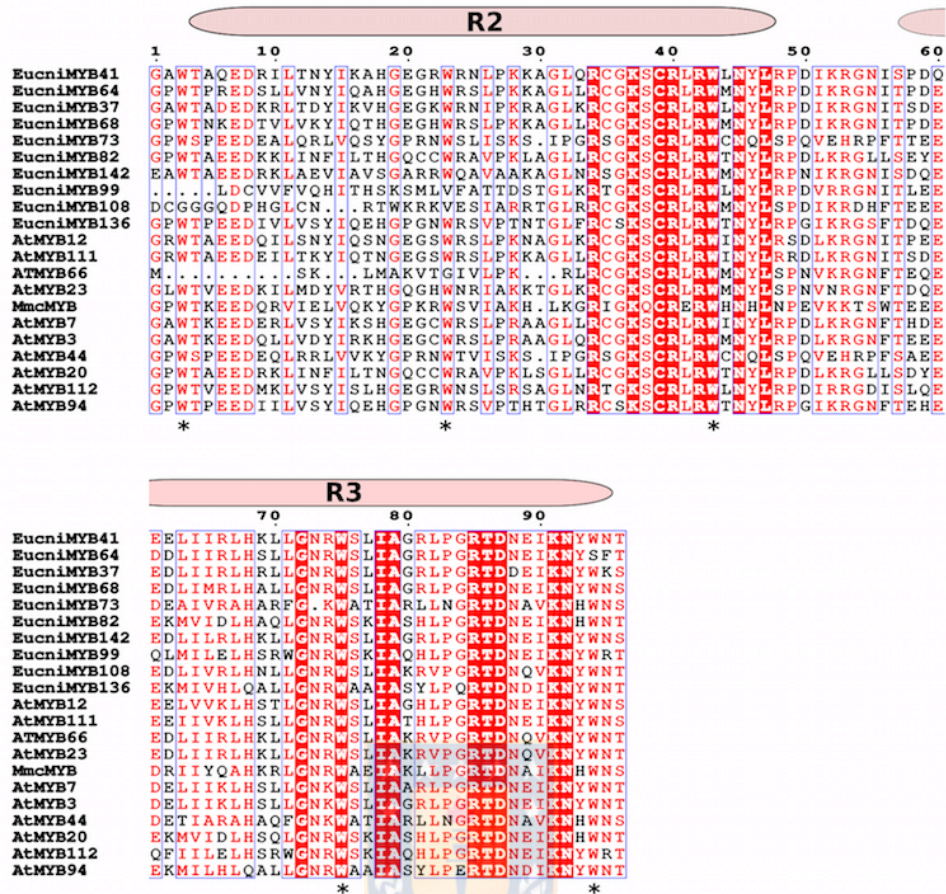


Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio MYB. Los diez factores de transcripción MYB-R2R3 de secuencia completa (Anexo 2), los factores de transcripción MYB-R2R3 de *A.thaliana* con identidad en BLAST a los factores de transcripción de *E.nitens* (Tabla 6) y el Mmc-MYB de *Mus musculus* (Nº de accesoión GenBank NP_034978). Los residuos idénticos se muestran en blanco sobre un fondo rojo, los residuos conservados en rojos y los residuos de triptófano (W) marcados con asteriscos (*). El alineamiento fue realizado en T-Coffe (<http://tcoffee.org.cat>) y la imagen fue realizada en ESPript (<http://ESPript.ibcp.fr>). Fuente: Elaboración propia.

Para el factor de transcripción EucniMYB64, se determinaron los residuos que dan estabilidad a la estructura terciaria de la proteína, estos consisten en residuos cargados que establecen puentes salinos entre las hélices que mantienen la orientación relativa. Como se muestra en la Figura 4, los cuatro puentes salinos observados. En el dominio R2, R48 tiene interacción con E21 y R56 con D22, para el dominio R3, D76-Y108 y E75-R100.

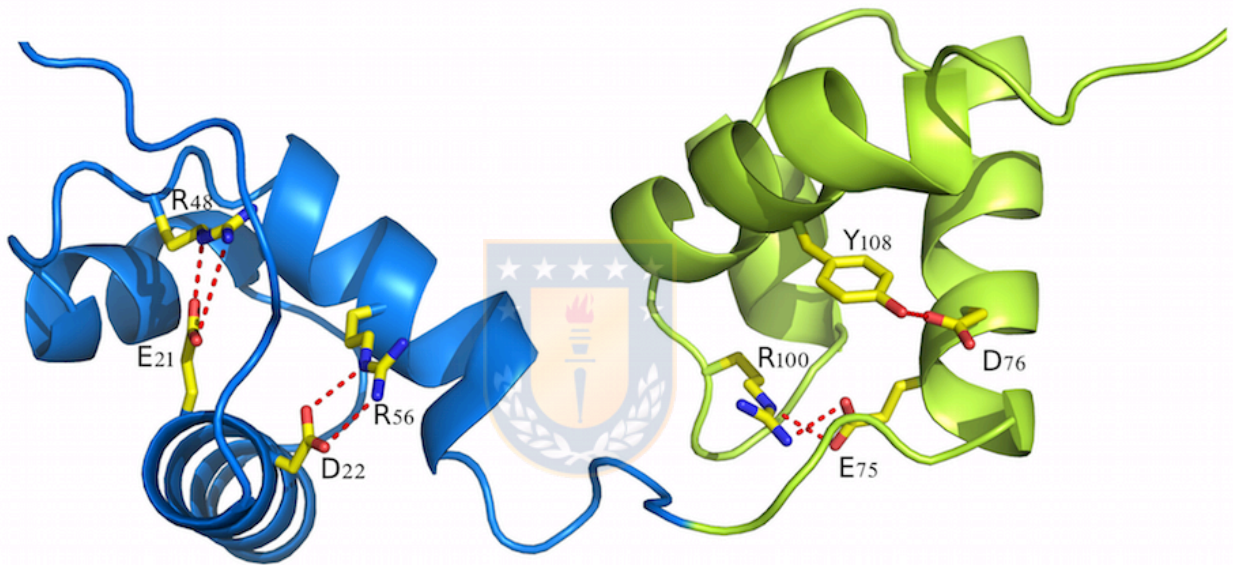


Figura 4. Estructura de los dominios R2 y R3 de EucniMYB64. La figura muestra los residuos que interactúan en la formación del núcleo del dominio. La estructura fue obtenida por el software RaptorX y visualizada en PyMOL v2.2. Fuente: Elaboración propia.

5.3 Expresión diferencial *in silico* de los factores de transcripción MYB-R2R3 de *E. nitens* en el perfil de aclimatación a baja temperatura

Se realizó el alineamiento de las secuencias pre-procesadas en cuatro condiciones , utilizando las tres réplicas por condición con la herramienta Bowtie 2 indexando como referencia el transcriptoma de *E. nitens* previamente anotado con *E.grandis* con la herramienta BLAST, de los 433.159 *contigs* 25.166 *contigs* representaron unigenes, y se incluyó la anotación realizada de los factores de transcripción MYB. El número de lecturas por gen fue extraído con la herramienta de samtools idxstats. Los conteos de lecturas de cada una de las réplicas fue utilizada como réplica biológica en el análisis de expresión de genes.

5.3.1 Visualización y exploración de los datos

Se utilizó el gráfico de escalamiento multidimensional (MDS) que muestra las distancias en términos del coeficiente de variación biológica (BCV) entre las bibliotecas medido en dos dimensiones. Este análisis se realizó antes del análisis de expresión diferencial, con el fin de visualizar la relación entre las bibliotecas y control de calidad.

Comparación entre tratamientos:

NA-AAH: Las bibliotecas 2 y 3 del tratamiento NA comparten un plano tanto en la dimensión 1 como en la 2 (Figura 5,a) , por lo que NA1 fue excluida de análisis posteriores de expresión diferencial. En lo que respecta al tratamiento aclimatado antes de la helada (AAH), se consideró la primera dimensión , debido a que AAH3 se encuentra más cercano a los tratamientos NA1 y NA2. Finalmente, NA2, NA3, AAH1 y AAH2 fueron el conjunto de bibliotecas con el cual se realizó el análisis de expresión diferencial (Figura 5,b).

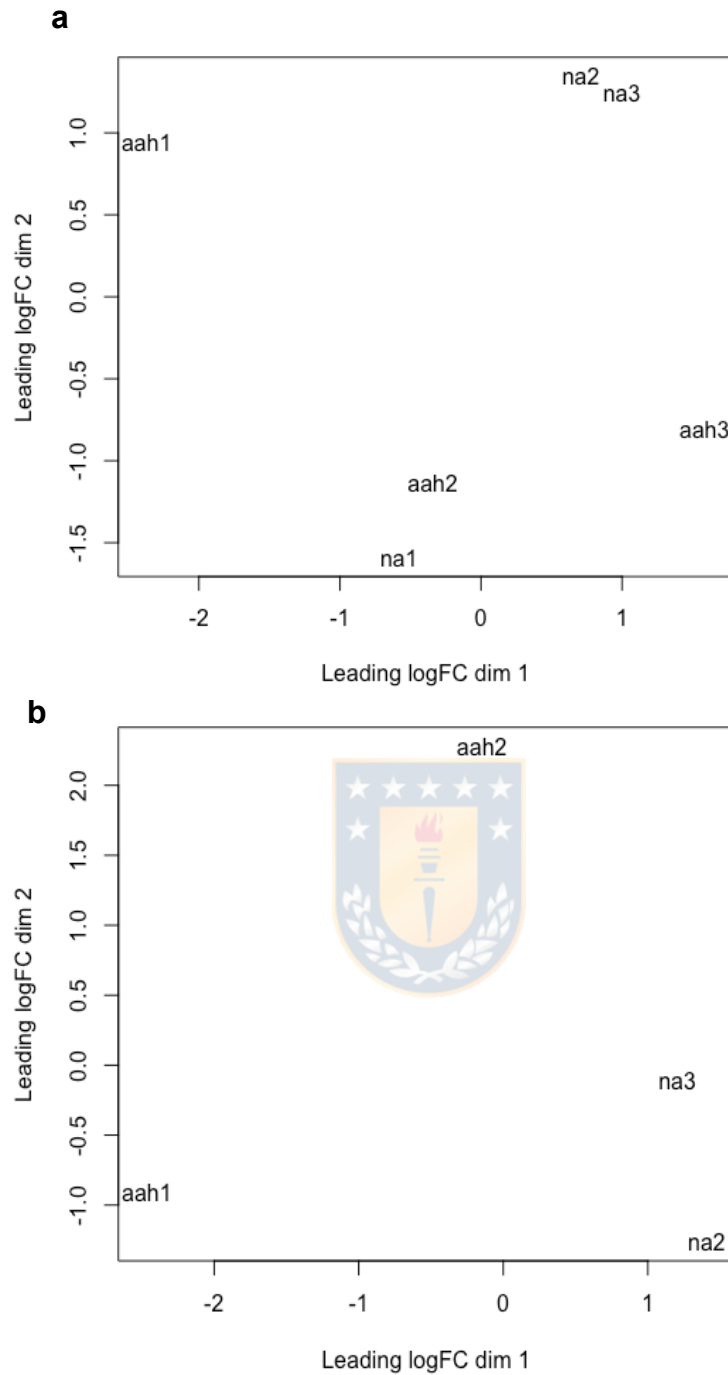


Figura 5. Grafico MDS para la comparación NA-AAH. a) antes y b) después de la eliminación de bibliotecas. Fuente: Elaboración propia.

NA-ADH: En el gráfico de escalamiento multidimensional para las bibliotecas de la condición NA y las correspondientes a aclimatadas después de la helada (ADH) estuvieron separadas en la primera componente (Figura 6). Sin embargo, la réplica NA1 fue removida, para disminuir la variabilidad de los datos.

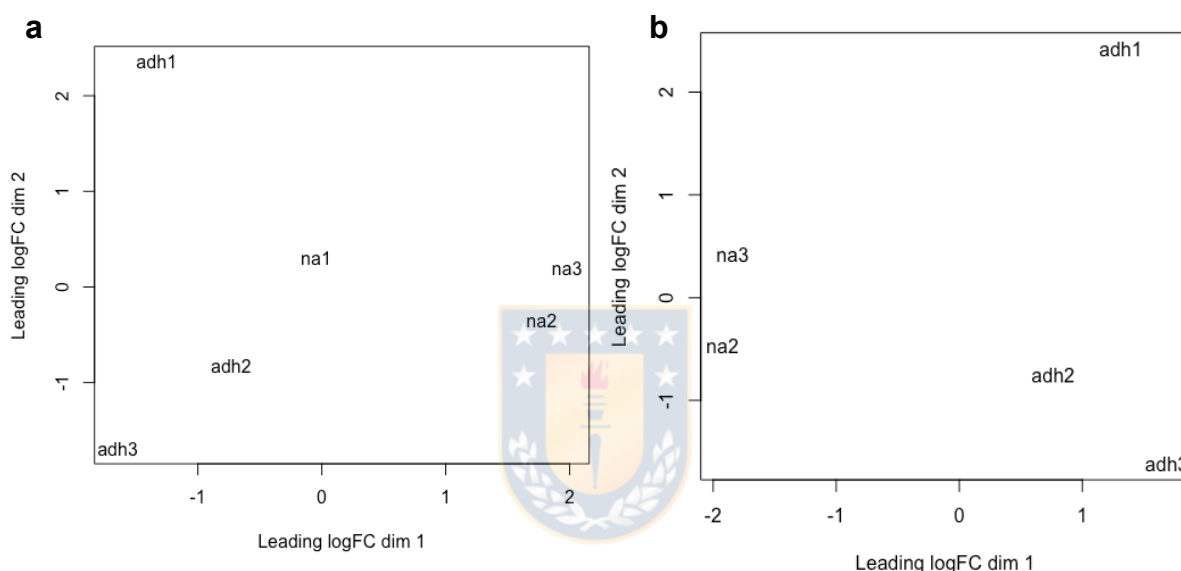


Figura 6. Grafico MDS para la comparación NA-ADH. a) antes y b) después de la eliminación de bibliotecas. Fuente: Elaboración propia.

NA-DA: En la primera dimensión se agrupan las bibliotecas de la condición no aclimatado NA2 y NA3 y al lado derecho del plano DA1 y DA2 de la condición desaclimatado, quedando excluidas las bibliotecas NA1 y DA3 (Figura 7, a). No obstante, al considerar la segunda dimensión se posicionan dos bibliotecas de cada tratamiento en la mitad superior e inferior. Puesto que la separación se presentó en ambas dimensiones, se consideró la primera dimensión del análisis, ya que posee la mayor varianza de los datos (Figura 7, b).

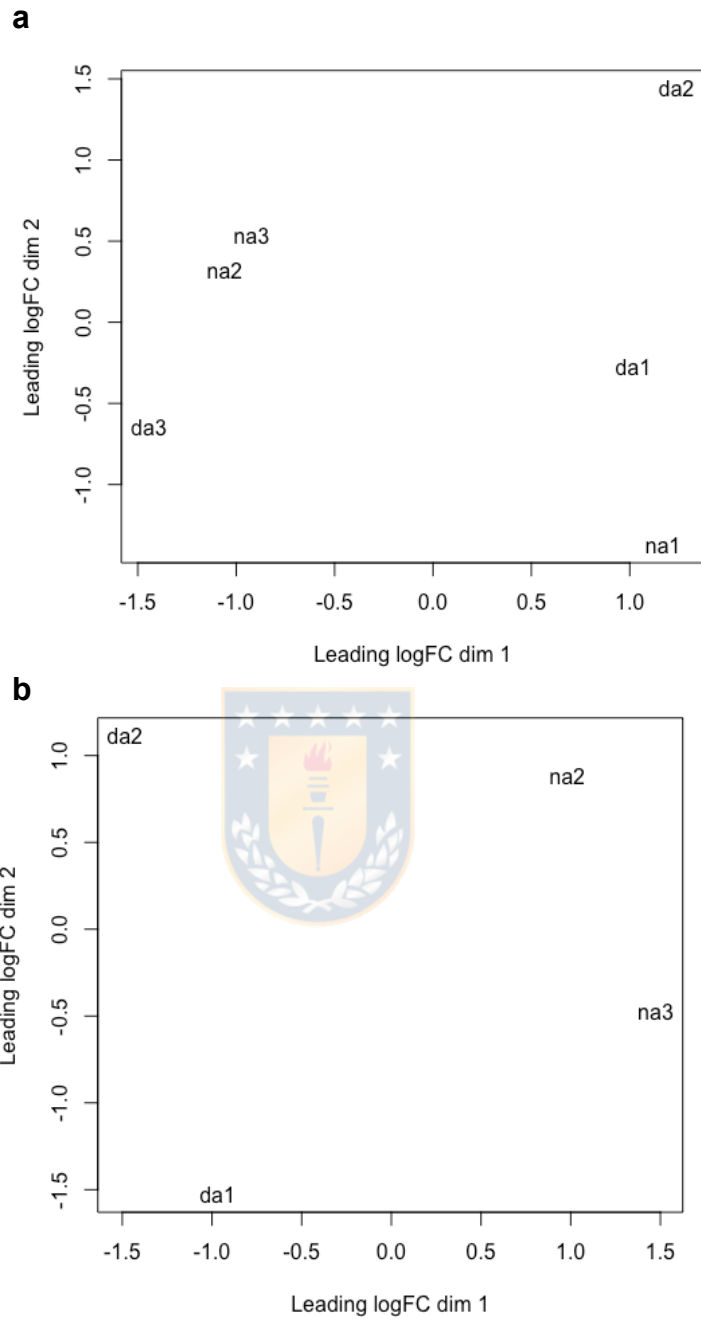


Figura 7. Gráfico MDS para la comparación NA-DA. a) antes y b) después de la eliminación de bibliotecas. Fuente: Elaboración propia.

AAH-ADH: Las bibliotecas AAH1 y ADH1, quedan separadas en la primera dimensión, estas fueron eliminadas, ya que podrían haber generado ruido en el análisis de expresión diferencial (Figura 8).

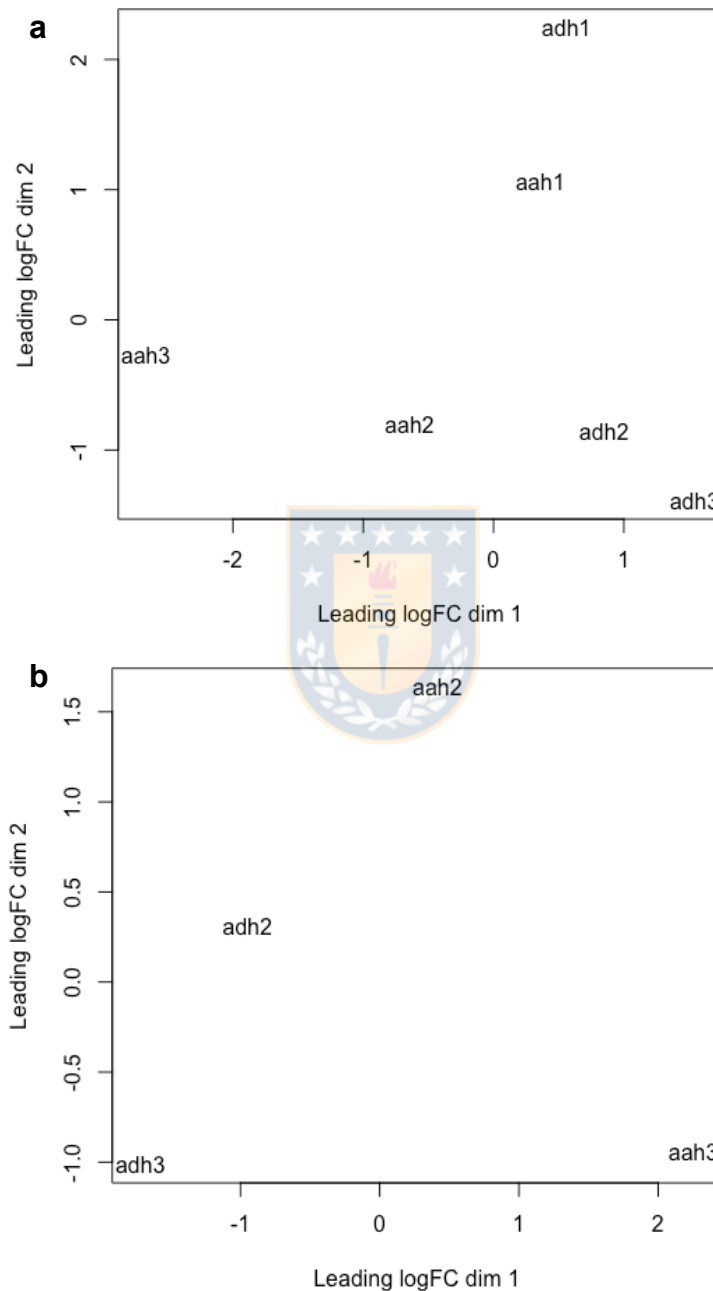


Figura 8. Gráfico MDS para la comparación AAH-ADH. a) antes y b) después de la eliminación de bibliotecas. Fuente: Elaboración propia.

AAH-DA: Esta comparación presentó dos bibliotecas de ambos tratamientos compartidas en un plano. En la dimensión 1, las bibliotecas DA3 y DA1 y AAH3 comparten un mismo plano al igual que las bibliotecas AAH1, AAH2, DA2 quedando a la izquierda y a la derecha del cero en el eje x respectivamente. Se consideró la primera dimensión obteniendo el mejor resultado con el conjunto AAH1, AAH2, DA1 y DA3 (Figura 9).

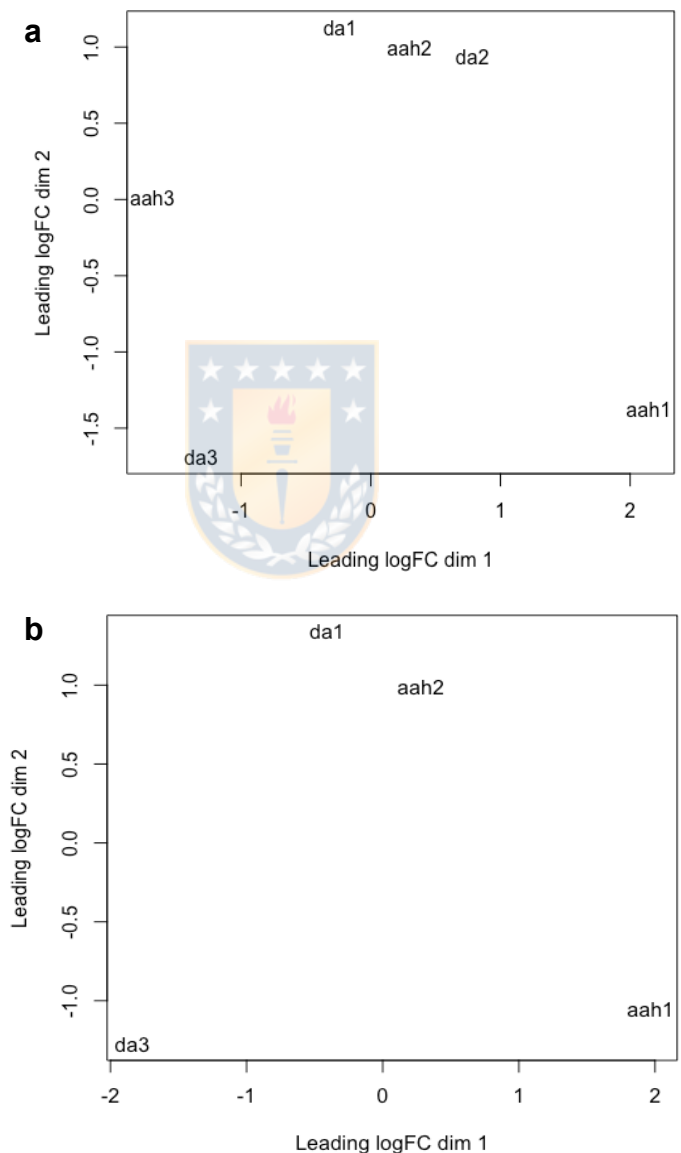


Figura 9. Gráfico MDS para la comparación AAH-DA. a) antes y b) después de la eliminación de bibliotecas. Fuente: Elaboración propia.

ADH-DA: Las bibliotecas correspondientes al estado aclimatado después de la helada (ADH), quedan separadas de las desaclimatadas (DA) por la dimensión 1. Por lo que se utilizaron el total de réplicas para el análisis de expresión de genes (Figura 10).

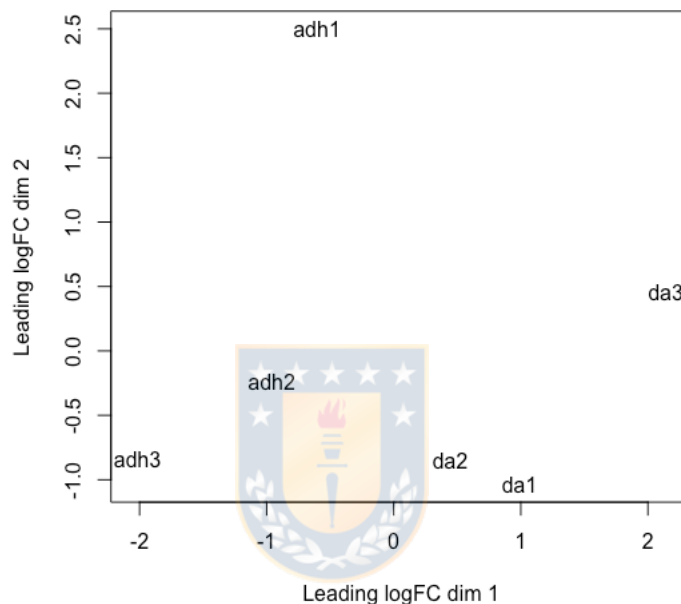


Figura 10. Gráfico MDS para la comparación ADH-DA. Fuente: Elaboración propia.

Las bibliotecas seleccionadas para realizar el análisis de expresión diferencial por edgeR fueron las que se muestran en gris en la Tabla 7. Las réplicas que no se agruparon en un mismo plano fueron eliminadas, ya que a mayor variabilidad de los datos la tasa de descubrimientos de falsos positivos (FDR) aumenta, disminuyendo la probabilidad de encontrar genes expresados diferencialmente.

Tabla 7. Bibliotecas utilizadas para realizar el análisis de expresión diferencial. Selección en base al análisis de los gráficos de escalamiento multidimensional.

Condición	Bibliotecas											
	NA			AAH			ADH			DA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NA-AAH												
NA-ADH												
NA-DA												
AAH-ADH												
AAH-DA												
ADH-DA												

Fuente: Elaboración propia.

5.3.2 Identificación de genes expresados diferencialmente

A través del análisis con edgeR se realizó la identificación de genes diferencialmente expresados para cada una de las seis comparaciones de los cuatro tratamientos (NA,AAH,ADH y DA). En la Tabla 8 se muestran los valores de dispersión de los datos, el coeficiente de variabilidad biológica (BCV), la cantidad de genes *up regulated* y *down regulated*, además del total de genes expresados diferencialmente expresados bajo los parámetros de FC establecidos. La eliminación de las muestras que no se agrupaban con sus respectivas réplicas biológicas, contribuyó a que el rango de dispersión (0,08025 - 0,12399) no fuera significativo, sino más bien bajo (tabla 8). El coeficiente de variación biológica (BCV), el cual especifica la variación de la abundancia relativa de los transcritos entre las muestras, refleja la presencia de poca variación entre las muestras consideradas para el análisis de expresión *in silico* (BCV <50%).

Tabla 8. Resumen de la cantidad de genes expresados diferencialmente NA: no aclimatado, AAH: aclimatado antes de la helada, ADH: aclimatado después de la helada, DA: desaclimatado. Dispersión de los datos, coeficiente de variación biológica (BCV), número de genes *up regulated*, *down regulated*, y número de genes totales expresados diferencialmente.

Comparación	Dispersión	BCV	<i>up-regulated</i>	<i>down-regulated</i>	Total
NA-AAH	0.08027	0.2833	385	263	648
NA-ADH	0.11844	0.3442	401	372	773
NA-DA	0.08025	0.2833	527	245	772
AAH-ADH	0.11369	0.3372	362	298	660
AAH-DA	0.12399	0.3521	147	146	293
ADH-DA	0.12299	0.3507	311	346	657

Fuente: Elaboración propia.

De los 20 factores de transcripción MYB-R2R3 evaluados *in silico*, el global tuvo un bajo valor de fold change (FC), dentro de estos *EucniMYB64* fue el gen regulado de manera más negativa y significativa logFC -1.99 en la comparación control y antes de helada (NA-AAH) (Figura 11 y Tabla 9). En la comparación control y después de helada (NA-ADH) los valores de expresión se mantuvieron bajos en el total de los MYB estudiados. Sin embargo, en la comparación antes de helada y después de helada, los valores aumentan y son significativos para los genes *EucniMYB64* y *EucniMYB68* (Figura 11 y Tabla 9) los que además tuvieron el mayor aumento en la acumulación transcritos en la transición aclimatación antes de la helada y la aclimatación después de la helada (AAH-ADH), es decir, cuando las temperaturas disminuyen a -2°C, estos genes fueron *down regulated* en el tratamiento de desaclimatación (Figura 11 y Tabla 9), como la mayoría los factores de transcripción MYBR2R3. Dado los resultados significativos de estos dos genes, fueron seleccionados para ser evaluados por qrt-PCR.

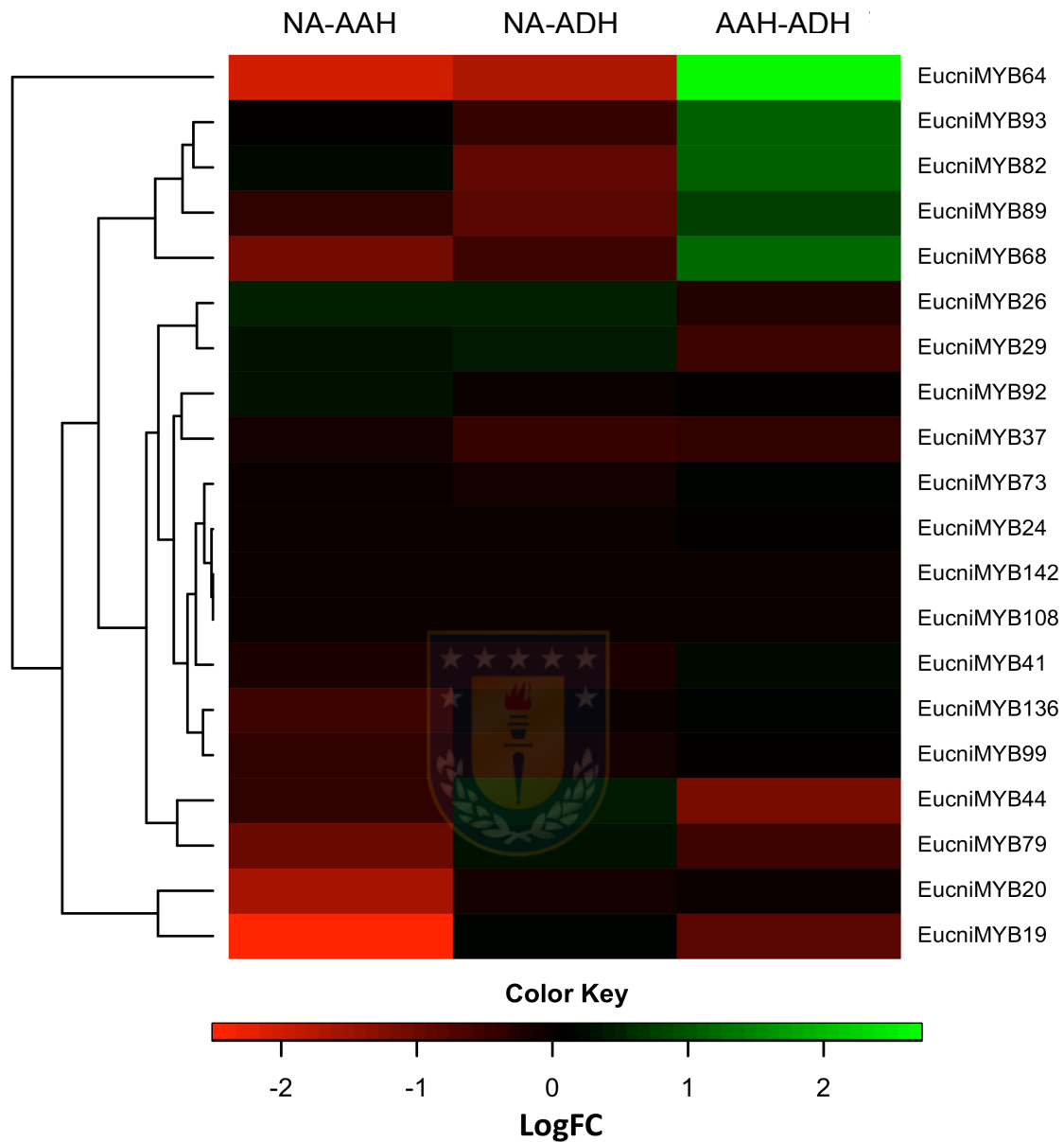


Figura 11. Mapa de calor para el tratamiento de aclimatación a frío por análisis *in silico* de los factores de transcripción MYB R2R3 en el transcriptoma de *Eucalyptus nitens*. Fuente: Elaboración propia.

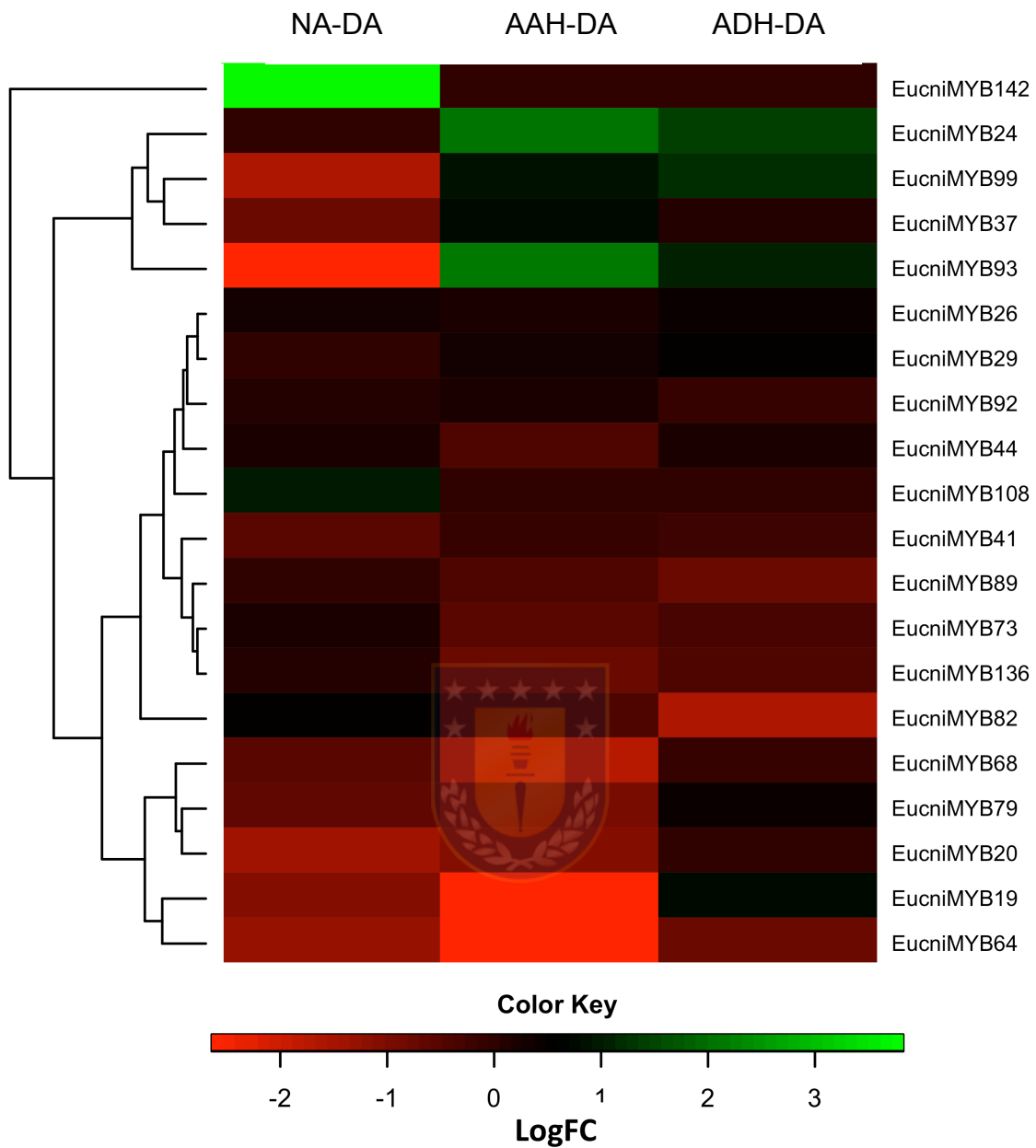


Figura 12. Mapa de calor para el tratamiento de desaclimatación a frío por análisis *in silico* de los factores de transcripción MYB R2R3 en el transcriptoma de *Eucalyptus nitens*. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Valores de expresión (FC) obtenidos mediante el análisis de expresión *in silico* para los 20 MYBR2R3

Transcrito	NA-AAH	NA-ADH	AAH-ADH	NA-DA	AAH-DA	ADH-DA
<i>EucniMYB73</i>	-0.041	-0.070	0.183	0.218	-0.489	-0.348
<i>EucniMYB93</i>	0.071	-0.438	1.087	-2.562	2.201*	1.099
<i>EucniMYB37</i>	-0.132	-0.450	-0.363	-0.736	0.710	0.069
<i>EucniMYB82</i>	0.230	-0.863*	1.104	0.559	-0.387	-1.587*
<i>EucniMYB41</i>	-0.229	-0.219	0.239	-0.495	-0.153	-0.259
<i>EucniMYB44</i>	-0.411	0.453*	-1.113*	0.185	-0.405	0.208
<i>EucniMYB29</i>	0.303	0.418	-0.576	0.047	0.302	0.530
<i>EucniMYB92</i>	0.333	-0.055	0.032	0.071	0.201	-0.115
<i>EucniMYB99</i>	-0.373	-0.079	0.079	-1.644*	0.884	1.204*
<i>EucniMYB89</i>	-0.387	-0.766	0.776	-0.053	-0.476	-0.711
<i>EucniMYB26</i>	0.529	0.456	-0.282	0.314	0.225	0.452
<i>EucniMYB136</i>	-0.561	0.006	0.182	0.087	-0.752	-0.381
<i>EucniMYB68</i>	-1.069	-0.549	1.185*	-0.500	-1.717*	-0.151
<i>EucniMYB79</i>	-0.987*	0.297	-0.536	-0.648	-0.979*	0.459
<i>EucniMYB64</i>	-1.991*	-1.667*	2.721*	-1.247*	-2.591*	-0.807
<i>EucniMYB20</i>	-1.595	-0.141	0.013	-1.349*	-1.123	0.024
<i>EucniMYB19</i>	-2.505	0.132	-0.838	-1.124*	-2.641	0.712
<i>EucniMYB108</i>	0	0	0	0.955	0	0
<i>EucniMYB142</i>	0	0	0	3.826	0	0
<i>EucniMYB24</i>	0	0	0.0334	0	2.070	1.348

*Valores que presentan diferencias significativas mediante análisis *in silico*.

Fuente: Elaboración propia.

5.4 Evaluación de la expresión qRT-PCR de los factores de transcripción MYB-R2R3 de *E.nitens* en el perfil de aclimatación a baja temperatura

La técnica qRT-PCR se utilizó para evaluar la expresión de los factores de transcripción *MYB64* y *MYB68* en la aclimatación al frío en muestras de ADNc de *E. nitens*, *E. globulus* (susceptible al frío) y un híbrido (*E. nitens* x *E. globulus*), tolerante al frío, en el tratamiento de aclimatación al frío (NA, AAH y ADH). Los resultados muestran que el factor de transcripción *MYB64* en la condición control NA, tiene un bajo nivel de expresión para los tres genotipos evaluados. La acumulación de transcritos aumentan para el híbrido en la condición AAH cuando las temperaturas alcanzan los 4°C. Sin embargo, para *E. nitens* y *E. globulus* (susceptible al frío) la expresión permanece sin diferencias significativas en comparación con la condición control. En la condición ADH cuando las temperaturas alcanzan los -2°C, la acumulación de los transcritos de *MYB64* alcanza los valores de expresión más altos dentro de los tres genotipos evaluados, siendo mayor en *E. nitens*, y significativa sobre los otros genotipos evaluados. Estos resultados indican que este factor de transcripción responde a frío, aumentando la acumulación de transcritos en la aclimatación al frío en los tres genotipos evaluados, siendo mayor en los genotipos tolerantes al frío (Figura 13, a). *MYB68* tuvo una expresión similar a *MYB64*, aumentando los niveles de expresión bajo el perfil de aclimatación a baja temperatura, alcanzando los niveles más altos en los tres genotipos después de la helada (ADH). En esta condición, la acumulación de transcritos tuvo los valores más altos en *E. nitens* y el híbrido, en comparación con *E.globulus* (Figura 13, b). En consecuencia, ambos factores de transcripción aumentaron su expresión por qRT-PCR en el tratamiento de aclimatación al frío, teniendo los valores relativos más altos de expresión en *E.nitens* tolerante al frío y el híbrido tolerante al frío, en comparación con el *E. globulus*. La comparación de los valores absolutos de FC en *E. nitens* difirió entre qRT-PCR y análisis *in silico*, aunque la correlación de Spearman fue baja, Spearman Rho = 0.3 (Anexo 4), los genes *EucniMYB64* y *EucniMYB68* se regularon al alza en la respuesta a la aclimatación al frío y los patrones de

expresión fueron concordantes para estos genes en respuesta a la aclimatación al frío, aumentando significativamente en la comparación de AAH-ADH en qRT-PCR y análisis *in silico* (Anexo 5).

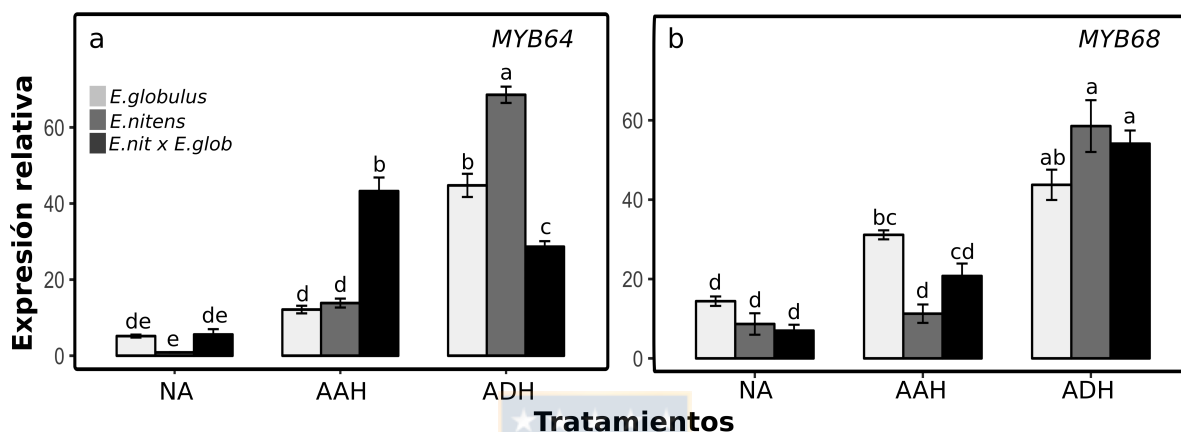


Figura 13. Análisis de la acumulación de transcritos de MYB64 y MYB68 . Evaluación en *Eucalyptus* spp. en el tratamiento de aclimatación al frío, el calibrador de la muestra correspondió a un rameto de *E.nitens* en NA. Las diferentes letras minúsculas en la parte superior de las barras (media + SE) indican diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de aclimatación y el genotipo evaluado con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). a) expresión relativa de MYB64. b) Expresión relativa de MYB68. Fuente: Elaboración propia.

5.5 Análisis filogenético y asociación funcional EucniMYB64 y EucniMYB68

El análisis filogenético muestra que las proteínas MYB64 y MYB68 forman un clado dentro de las proteínas MYB-R2R3 anotadas en *E.nitens*. El factor de transcripción MYB64 de *E.globulus*, *E.nitens* x *E.globulus*, *E.nitens* y *E.grandis* se agrupan dentro de un subclado. Los factores de transcripción MYB68 de

E.globulus, *E.nitens*, *E.grandis* y el híbrido, forman otro subclado (Figura 14). AtMYB12 y AtMYB111 forman un clado aparte en el árbol. Las ocho proteínas MYB-R2R3 restantes se agruparon con la proteína MYB con la cuál fueron anotadas mediante herramientas bioinformáticas utilizando el genoma de *E.grandis*.

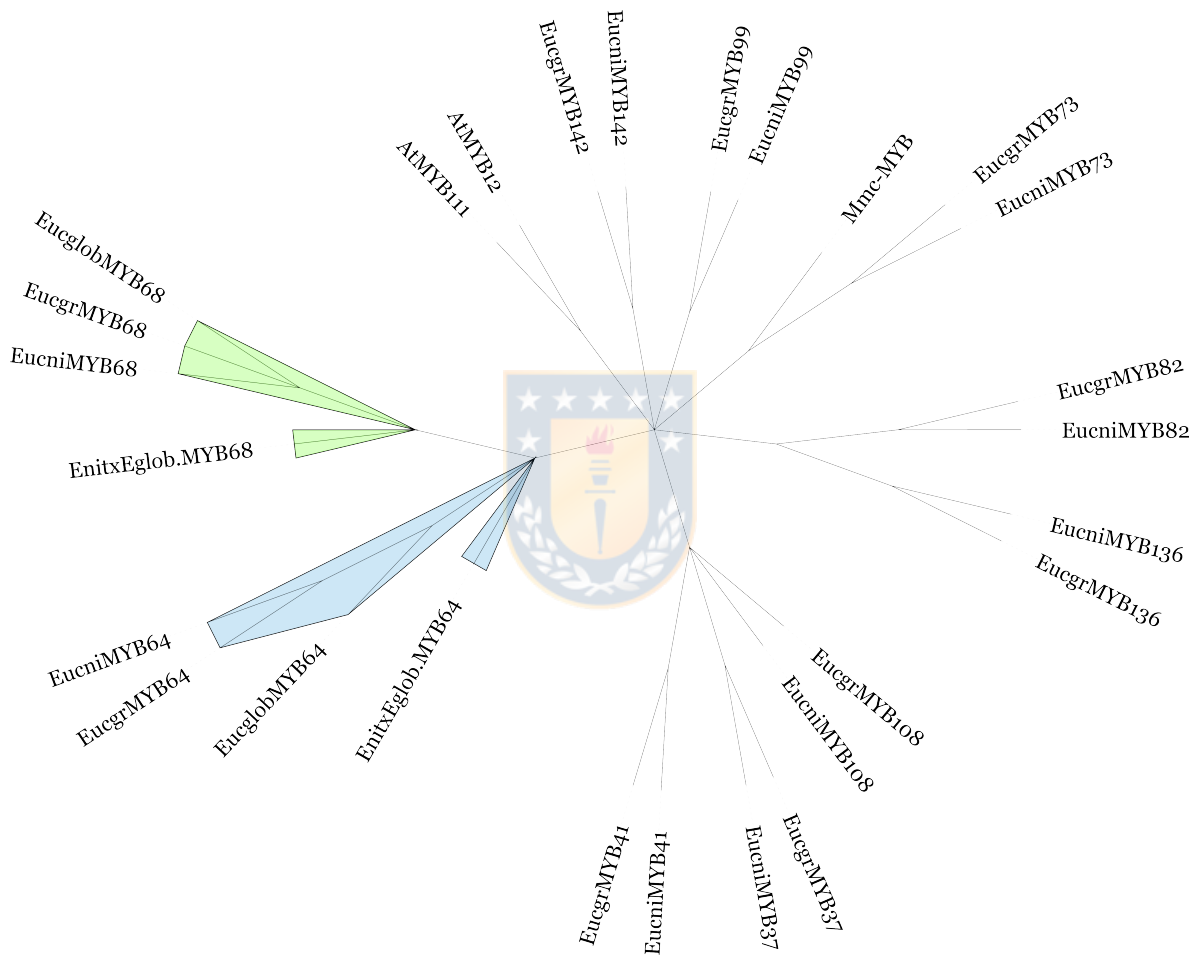


Figura 14. Análisis filogenético de las 10 proteínas R2R3-MYB de *Eucalyptus nitens*. Se incluyeron las secuencias de *E.grandis*, las secuencias de MYB64 y MYB68 del híbrido (*E. nitens* x *E.globulus*) y *E.globulus* (Anexo 2), los factores de transcripción AtMYB12 y AtMYB111, Mediante el método de máxima verosimilitud en RAXML v8. En azul el clado de MYB64 y en verde el clado de MYB68. Fuente: Elaboración propia.

Para comprender las interacciones y en que proceso participan las proteínas R2R3-MYB, MYB64 y MYB68, se calcularon las redes de interacción mediante la base de datos de *A. thaliana* en STRING. La secuencia peptídica de EucniMYB64 tuvo identidad con AtMYB12 (e-value $2.9e-51$), esta proteína regula principalmente la ruta de síntesis de flavonoides, interactuando con flavonol sintasa (FLS1), chalcona sintasa (TT4/CHS), Flavonol 3 hidroxilasa (F3H), flavanona 4-reductasa (DFR), Leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX), Flavonol sintasa 3 (FLS3), Chalcona-flavonona isomerasa 1 (TT5), Trans-cinamato 4-monooxigenasa (C4H), el factor de transcripción TT8, proteína de la familia bHLH (TT8) y citocromo p450 monooxigenasa (CYP78A9) (Figura 14, a).

EucniMYB68, tuvo identidad con AtMYB111 (e-value $1.3e-55$), esta proteína interactúa en la mismas red de proteínas que AtMYB12, por lo que ambas son proteínas involucradas en la ruta de biosíntesis de flavonoides (Figura 15,b).

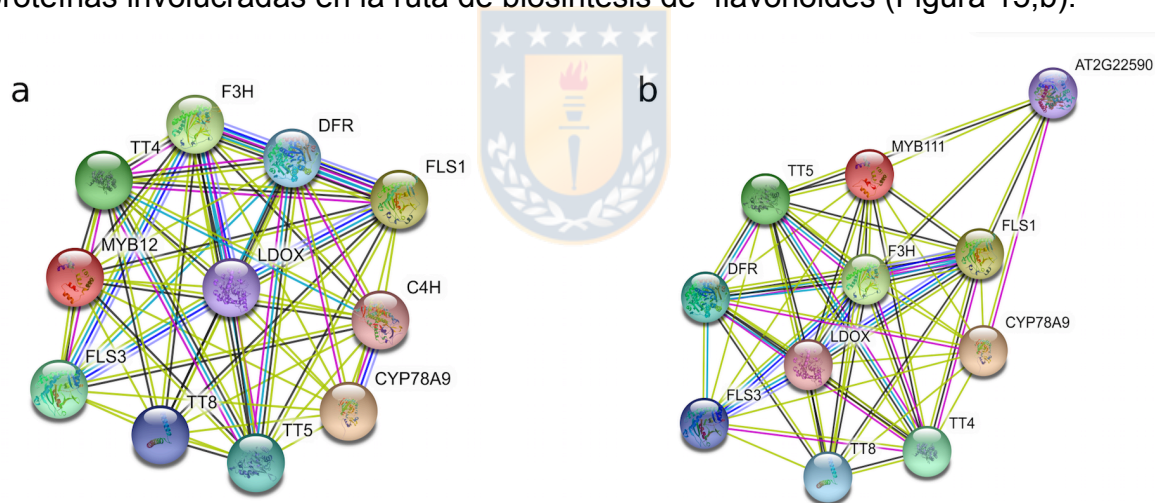


Figura 15. Redes de interacciones proteína-proteína. Análisis de los factores de transcripción MYB de *A.thaliana* con identidad con los R2R3-MYB candidatos en respuesta a la aclimatación al frío. Redes de interacciones predichas en STRING de las proteínas MYB de *A.thaliana* con mayor identidad a los factores de transcripción R2R3-MYB candidatos en respuesta a la aclimatación al frío. a)

AtMYB12: proteína de mayor identidad con EucniMYB64. b) proteína de mayor identidad con AtMYB111 / EucniMYB68. Fuente: STRING (<https://string-db.org>).

Mediante el análisis de expresión *in silico* del transcriptoma de *E.nitens* realizado previamente para determinar la expresión de los factores de transcripción MYB-R2R3, se utilizó para realizar la búsqueda de los genes que formaban parte de la red de interacción anotados previamente en el transcriptoma de *E.nitens* con las secuencias de *E.grandis*. Los genes que forman la red de interacción con las proteínas MYB64 y MYB68 fueron genes *down regulated* en la comparación NA-AAH y NA-ADH (Figura 16 y Tabla 10) y en la comparación AAH-ADH fueron genes *up regulated*, siendo regulados positivamente y de manera significativa el gen FLS1 y el gen C4H: Trans-cinnamato 4-monoxigenasa, enzima que participa en el metabolismo de la fenilalanina y en la biosíntesis de fenilpropanoides (Figura 16). La mayoría de estos genes se comportaron como genes *down regulated* en el tratamiento de desaclimatación (Figura 16 y Tabla 10). Los tratamientos en los que se produjo una mayor acumulación de transcritos por análisis *in silico* fue concordante con la expresión de MYB64 y MYB68 en el perfil de aclimatación a frío.

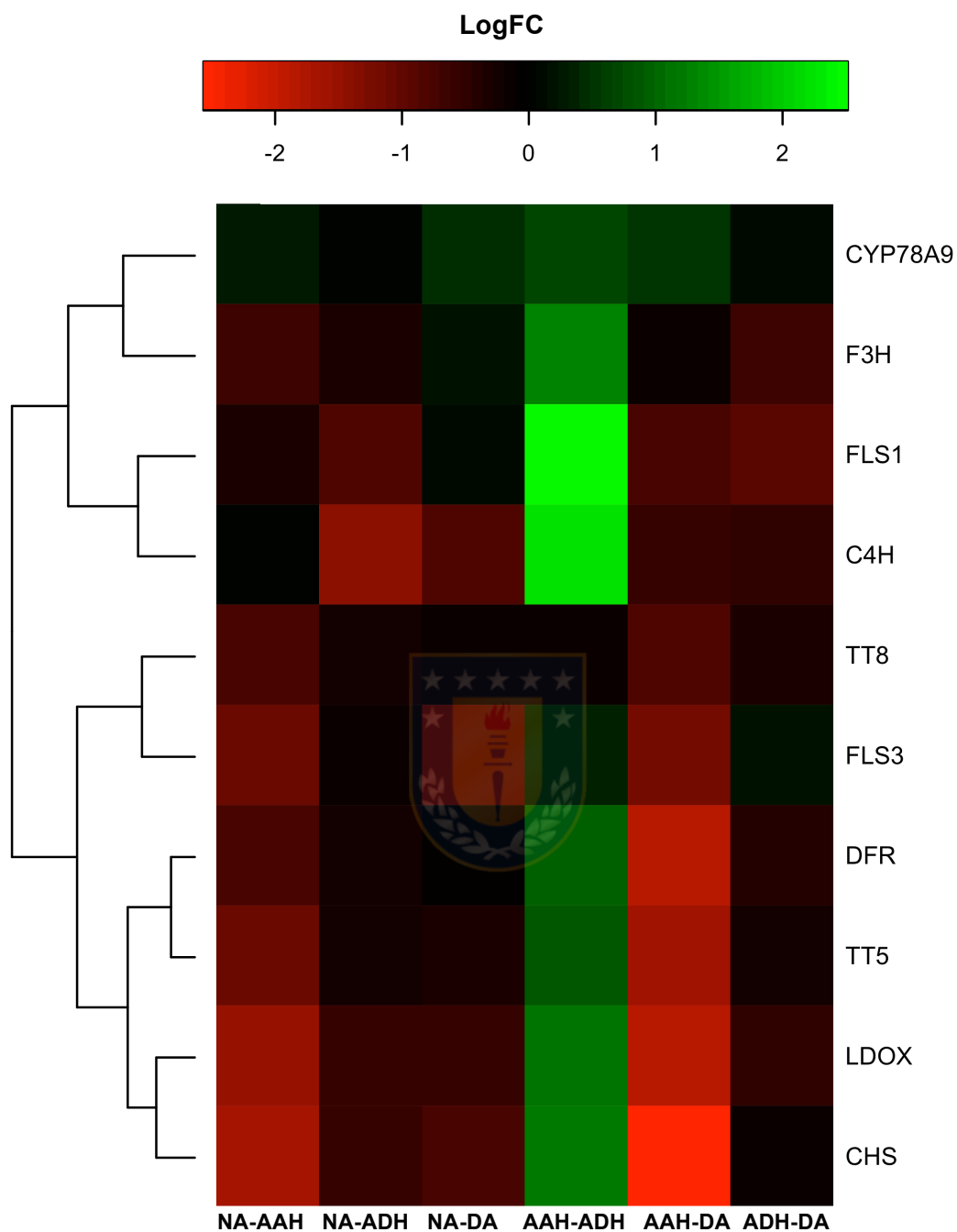


Figura 16. Mapa de calor para de *Eucalyptus nitens* de las proteínas que interactúan con EucniMYB64 y EucniMYB68. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Valores de expresión (FC) obtenidos mediante el análisis de expresión *in silico* para las proteínas identificadas en STRING en el transcriptoma de *E.nitens*.

Gen	NA-AAH	NA-ADH	AAH-ADH	NA-DA	AAH-DA	ADH-DA
FLS1	-0.348	-0.789	2.514*	-0.752	-0.929	0.084
TT4/CHS	-1.716*	-0.533	1.218*	-2.565	-0.183*	-0.786
DFR	-0.745	-0.214	0.929	-1.859	-0.387*	-0.107*
LDOX	-1.484	-0.534	1.119*	-1.864	-0.491	-0.558
C4H	0	-1.385*	2.257*	-0.617	-0.499	-0.797
CYP78A9	0.263	-0.009	0.731	0.562	0.093*	0.446
FLS3	-1.116	-0.126	0.373*	-1.178	0.181	-0.834*
TT5	-1.095	-0.209	0.852	-1.578	-0.260	-0.317*
TT8	-0.714	-0.215	-0.155	-0.792	-0.328	-0.154*
F3H	-0.679*	-0.355	1.278*	-0.153	-0.641	0.193

Fuente: Elaboración propia.

6 DISCUSIÓN

Muchos ensambladores *de novo* se han desarrollado con algoritmos específicos para ensamblajes de transcriptoma utilizando lecturas de plataformas como Illumina y Roche 454. Sin embargo, su efectividad para el ensamblaje *de novo* de Ion Torrent sigue siendo relativamente inexplorada (Amin et al. 2014). La estrategia de ensamblaje *de novo* utilizando MIRA4 dio como resultado métricas muy similares a las obtenidas en otros proyectos de transcriptómica en *Eucalyptus* spp. (Lagos 2015). Los *contigs* redundantes resultaron de múltiples *contigs* contruidos a partir de lecturas de genes individuales. Mediante la estrategia de eliminación de redundancia, el número de transcritos redundantes disminuyó, utilizando los programas CD-HIT-EST y CAP3, además permitió obtener *contigs* de mayor tamaño, aumentando el tamaño medio en aproximadamente 200pb y a la vez un valor N50 mayor. Esta estrategia de eliminación de redundancia ya había sido utilizada en otras investigaciones, en grupos de datos de ARN-seq en *A.thaliana*, aumentando el tamaño medio de *contigs*, el N50 y disminuyendo redundancia (Ono et al. 2015).

Utilizando el transcriptoma global en respuesta a frío de *E.nitens* se identificaron 20 secuencias con identidad a factores de transcripción MYB-R2R3 de *E.grandis*. El tipo de proteína R2R3 se han reportado como el tipo de proteína MYB mayoritariamente relacionada en respuesta al estrés abiótico en plantas (Ambawat 2013; Roy et al. 2015; Li et al. 2015; Gao et al. 2016; Shingote et al. 2017; Liu 2017; Erpen et al. 2018). Diez secuencias presentaron el dominio R2R3-MYB completo en el transcriptoma global de *E. nitens*, bajo un perfil de aclimatación al frío. Para cada una de las proteínas MYB se realizó la predicción de la estructura secundaria y terciaria, el alineamiento múltiple constató la alta conservación de residuos en el dominio MYB, la repetición R2 presentó tres residuos de triptófano espaciados regularmente y la repetición R3 incluyó dos residuos de triptófano regulares, las diez proteínas MYB tuvieron, sus homologos en *A.thaliana* y el

dominio MYB R2R3 de *Mus musculus* tuvieron un 94% de similitud de secuencia, la alta conservación del dominio R2R3 en diferentes especies ha sido descrita en diversos estudios (Pugliesi et al. 2013; Du et al. 2015; He et al. 2016). Para MYB64 se identificaron los residuos cargados que forman los cuatro los puentes salinos que dan estabilidad al dominio R2R3, estos residuos conservados del dominio ya han sido reportados previamente por Hichri et al. (2011).

En el análisis *in silico* del perfil de aclimatación al frío, el mayor número de genes MYB *up-regulated* se identificaron en la transición AAH-ADH y fueron regulados negativamente en el tratamiento de desaclimatación. El factor de transcripción *EucniMYB64* y *EucniMYB68* aumentaron sus niveles de transcripción durante la aclimatación a baja temperatura, específicamente en la transición aclimatado antes de helada y aclimatado después de helada, cuando las temperaturas alcanzaron los -2°C, teniendo los niveles de expresión significativos más altos. Esta expresión fue evaluada en el tratamiento a frío por qRT-PCR en un híbrido *E. nitens* x *E. globulus* genotipo tolerante a frío y en un genotipo de *E. globulus* sensible a frío. *MYB64* y *MYB68* respondieron a frío en el total de los genotipos estudiados, *MYB64* tuvo una mayor expresión en el híbrido en la condición antes de heladas cuando las temperaturas alcanzan los 4°C. Sin embargo, en *E. nitens* tuvo la mayor acumulación después de la helada nocturna de -2°C (ADH) al igual que *MYB68*. Al correlacionar los valores de expresión entre el análisis de qRT-PCR y el análisis *in silico* para *E. nitens* de los genes R2R3-MYB, se obtuvo un bajo coeficiente de correlación. Las diferencias observadas en los valores de fold change podrían deberse a la estimación de la expresión génica diferencial, pudiendo estar en relación con los genes de referencia seleccionados para normalizar la expresión génica en el análisis de qRT-PCR (Gaete-Loyola et al. 2017). Por otra parte, la presencia de genes homólogos y secuencias parcialmente reconstruidas, también puede afectar el análisis de la expresión *in silico*. Las diferencias al comparar la expresión en ambos tipos de análisis ya se han reportado anteriormente (Li et al. 2015; Wang et al. 2013; Gaete-Loyola et al. 2017). Sin embargo, tanto el gen *EucniMYB64* como el gen *EucniMYB68* mostraron la misma dirección de regulación (regulación positiva) tanto en el análisis por qRT-

PCR como en la expresión *silico*, con un aumento significativo en la comparación AAH-ADH, y esta expresión es regulado al alza en *E. nitens*, por sobre la expresión en el híbrido *E. nitens x E.globulus* y un genotipo sensible a frío de *E. globulus*. La proteínas MYB64 y MYB68 de *E. grandis* son homólogas con AtMYB12 y AtMYB111, de *A. thaliana* respectivamente, ambas proteínas se han descrito como activadores de la síntesis de flavonoides en plantas (Mehertens et al. 2005; Pandey et al. 2015; Schulz et al. 2016; Blanco et al. 2018; Wang et al. 2018) y como un gen activado durante la aclimatación al frío y la congelación en plantas (Schulz et al. 2016; Wang et al. 2016; Bathia et al. 2018). Se ha reportado la implicancia de los flavonoides en la defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), y cómo la absorción de las ROS ya no solo juega un papel en la tolerancia a bajas temperaturas por encima de 0°C, sino en la tolerancia al congelamiento, informando el rol de AtMYB12 y AtMYB111 en este proceso (Schulz et al. 2016). Si bien en el análisis filogenético AtMYB12 y AtMYB111 se agruparon en un clado y los factores de transcripción MYB64 y MYB68 en otro clado, esto puede guardar relación a que son especies pertenecientes a géneros diferentes y taxonomías contrastantes, sin embargo, el análisis de las redes reguladoras proteína-proteína con las secuencias peptídicas de MYB64 y MYB68 en *A. thaliana*, confirmó que estos dos factores de transcripción están involucrados en la vía de síntesis de flavonoides y que la mayor identidad para EucniMYB64 es con AtMYB12 y para EucniMYB68 es con AtMYB111, estas proteínas forman una red de interacción semejante en relación a la síntesis de flavonoides. En general el modo de regulación de la ruta de los flavonoides es específico para cada especie, pudiendo implicar un factor de transcripción MYB que actúa por sí solo o la formación de un dímero MYB-bHLH o un complejo MBW (MYB-bHLH-WER). En *A. thaliana*, AtMYB12 y AtMYB111 son independientemente capaces de activar los genes que codifican para chalcona sintasa (CHS), la chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y la flavonol sintasa (FLS) determinando el contenido de flavonol (Mehrtens et al., 2005, Stracke et al., 2007, Pandey et al., 2015, Schulz et al. 2016). Al observar el análisis *in silico* de estas proteínas se puede observar un aumento en la expresión en frío, en la transición AAH-ADH de

los genes que regulan la síntesis de flavonoides. Los genes FLS, C4H, F3H y CHS fueron los genes con mayor regulación positiva, genes altamente activados por estos factores de transcripción (Figura 15). Luego, al comparar la expresión en el tratamiento de desaclimatación, estos genes fueron regulados negativamente, al igual que los factores de transcripción MYB 64 y MYB 68 (Figura 11 y Figura 15). Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en *A. thaliana*, donde la expresión de los genes AtMYB12 y AtMYB111 se relaciona con una expresión inducida de los genes clave de biosíntesis de flavonol, como C4H, F3H, CHS y FLS, especialmente después de la aclimatación al frío (Schulz et al.2016). A través de nuestros resultados podemos indicar, de acuerdo con los niveles de expresión obtenidos, que los factores de transcripción MYB64 y MYB 68 son genes con un papel en la aclimatación al frío en estas *Eucalyptus* spp., con una mayor expresión en una especie tolerante a frío, *E. nitens*, esto según antecedentes estaría vinculado a una regulación en la síntesis de flavonoides, según los informes en *A. thaliana*, como un posible mecanismo protector de los flavonoides durante la congelación en la eliminación de ROS (Wang et al. 2006). La protección directa de las membranas por congelación son otros mecanismos posibles a través de los cuales los flavonoides podrían aumentar la tolerancia a la congelación de las hojas, órganos utilizados para este estudio, ya que los flavonoides se han localizado tanto en vacuola, núcleo y cloroplastos (Agati et al. 2012), orgánulos que pueden protegerse durante la congelación de las hojas. Se requiere más investigación para comprender los mecanismos por los cuales *E. nitens* es una especie con una tolerancia al frío de hasta -15°C, nuestro estudio abre un camino para dilucidar el papel de los factores de transcripción de MYB en la aclimatación al frío, dando las bases a estudios futuros para determinar su funcionalidad y regulación en *Eucalyptus nitens*.

7 CONCLUSIÓN

Se identificaron 20 factores de transcripción MYB-R2R3 de *E. nitens*. Diez secuencias contenían el dominio R2R3 completo. El análisis *in silico* mostró que el factor de transcripción *MYB64* tuvo una mayor abundancia de transcritos en respuesta a la aclimatación al frío en *E. nitens*. La expresión relativa de *MYB64* y *MYB68* por qRT-PCR en las especies de *E. nitens*, híbrido (*E. nitens* x *E. globulus*) y *E. globulus*, validan que son factores de transcripción inducidos por la aclimatación al frío, siendo mayor y significativa la expresión relativa de *MYB64* en *E. nitens*.



8 BIBLIOGRAFÍA

Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong C, Fujii H, Zheng X, Zhu J. 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37636-37645.

Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lioman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protei database search programs. *Nucleid Acid Research* 25:3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

Ambawat S, Sharma P, Yada R, & Yadav R. 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 19(3): 307-21.

Amin S, Prentis J, Gilding K, & Pavasovic A. 2014. Assembly and annotation of a non-model gastropod (*Nerita melanotragus*) transcriptome: a comparison of de novo assemblers. *BMC research notes*, 7, 488. doi:10.1186/1756-0500 7-488

An J, Li R, Qu F, You C, Wang X, Hao Y. 2018. R2R3-MYB transcription factor Md MYB 23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. *The Plant Journal*.

Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson P, Saedler H. 1987. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal*, 6(12), 3553-3558.

- Arratia J, Aguirre J. 2013. Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*, 16(2), 98-108.
- Bhatia C, Pandey A, Gaddam S, Hoecker U & Trivedi P. 2018. Low temperature enhanced flavonol synthesis requires light-associated regulatory components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 59(10), 2099-2112.
- Blanco E, Sabetta W, Danzi D, Negro D, Passeri V, Lisi A, Paolocci F, Sonnante G. 2018. Isolation and Characterization of the Flavonol Regulator CcMYB12 From the Globe Artichoke [*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Frontiers in plant science*, 9, 941. doi:10.3389/fpls.2018.00941
- Busk P, Pagès, M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant molecular biology*, 37(3), 425-435.
- Cao P, Azar S, SanClemente H, Mounet F, Dunand C, Marque G, Teulière C. 2015. Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Family in *Eucalyptus grandis*: An Intriguing Over-Representation of Stress-Responsive DREB1/CBF Genes. *PloS one* 10(4):e0121041-e0121041
- Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S. 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25:288–289
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu, J. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 444-451.

Cutler S, Rodriguez P, Finkelstein R, Abrams S. 2010. Abscisic Acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61 : 651-679.

D'Amelia V, Aversano R, Ruggiero A, Batelli G, Appelhagen I, Dinacci C, Carpato, D. 2018. Subfunctionalization of duplicate MYB genes in *Solanum commersonii* generated the cold-induced ScAN2 and the anthocyanin regulator ScAN1. *Plant, cell & environment*, 41(5), 1038-1051.

Donofrio N, Oh Y, Lundy R, Pan H, Brown D, Jeong J, Dean R. 2006. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(9), 605-617.

Du H, Liang Z, Zhao S, Nan M, Tran L, Lu K, ... & Li, J. 2015. The evolutionary history of R2R3-MYB proteins across 50 eukaryotes: new insights into subfamily classification and expansion. *Scientific reports*, 5, 11037.

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*; 15:573-81

Erpen L, Devi H, Grosser J, Dutt M. 2018. Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(1):1-25.

Feike J, Jürgens K, Hollibaugh J, Krüger S, Jost G, Labrenz M. 2012. Measuring unbiased metatranscriptomics in suboxic waters of the central Baltic Sea using a new in situ fixation system. *The ISME journal*, 6(2): 461.

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, Villarroel C, Valenzuela S. 2010. Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. *Trees* 24: 1109-1116. doi: 10.1007/s00468-010-0483-0.

Franco-Zorrilla J, López-Vidriero I, Carrasco J, Godoy M, Vera P, Solano R. 2014. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 2367-2372. doi: 10.1073/pnas.1316278111

Gaete-Loyola J, Lagos C, Beltrán M, 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.

Gao M, Li G, McCombie W, Quiros C. 2005. Comparative analysis of a transposon rich *Brassica oleracea* BAC clone with its corresponding sequence in *A. thaliana*. *Theoretical and applied genetics*, 111(5), 949-955.

Gao F, Zhao H, Yao H, Li C, Che H, Wang A, Wu Q. 2016. Identification, isolation and expression analysis of eight stress-related R2R3-MYB genes in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Plant cell reports*, 35(6):1385-1396.

García E, Sotomayor A, Silva S, Valdebenito G. 2000. Establecimiento de plantaciones forestales: *Eucalyptus* sp. Instituto Forestal. Valdivia. Chile. Disponible en: <http://biblioteca.infor.cl/DataFiles/14148.pdf>

Gonnet G, Cohen M, Benner S. 1992. "Exhaustive matching of the entire protein sequence database". *Science*. 256 (5062): 1443-5

- Grattapaglia D, Vaillancourt R, Shepherd M, Thumma B, Foley W, Külheim C. 2012. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes* 8(3): 463-508.
- Guzmán R. 2009. Análisis Funcional y Estructural del Promotor del Gen CBF-1 de *Eucalyptus Globulus* en la Respuesta a Estrés por Frío. Memoria de título. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Depto. Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Chile
- Hannah M, Heyer A, Hinch D. 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 1(2): e26.
- He Q, Jones D, Li W, Xie F, Ma J, Sun R, ... & Zhang B. 2016. Genome-wide identification of R2R3-MYB genes and expression analyses during abiotic stress in *Gossypium raimondii*. *Scientific reports*, 6, 22980.
- Heino P, Palva E. 2004. Signal transduction in plant cold acclimation. *Plant Responses to Abiotic Stress* 4:151-186.
- Hichri I, Deluc L, Barrieu F, Bogs J, Mahjoub A, Regad F, Lauvergeat V. 2011. A single amino acid change within the R2 domain of the VvMYB5b transcription factor modulates affinity for protein partners and target promoters selectivity. *BMC plant biology*, 11(1): 117
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9(9): 868-77
- Igartúa D, Monteoliva S. 2010. Densidad básica, longitud de fibras y crecimiento en dos procedencias de *Eucalyptus globulus* en Argentina. *Bosque (Valdivia)*, 31(2), 150-156.

INFOR. 2017. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Citado el 5/03/18.
Disponibile en: http://wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#/0

INFOR. 2018. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Citado el 5/02/19.
Disponibile en: <https://wef.infor.cl/publicaciones/anuario/2018/Anuario2018>

Janská A, Maršík P, Zelenková S, Ovesná J. 2010. Cold stress and acclimation what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*, 12(3), 395-405.

Jiang C, Gu J, Chopra S, Gu X, Peterson T. 2004. Ordered origin of the typical two-and three-repeat Myb genes. *Gene*, 326, 13-22.

Jin J, Tian F, Yang D, Meng Y, Kong L, Luo J, Gao G. 2017. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D1040-D1045.

Katoh, Kazutaka, Daron M. Standley. "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability." *Molecular biology and evolution* 30.4 (2013): 772-780.

Keller G, Marchal T, SanClemente H, Navarro M, Ladouce N, Wincker P, Marque C. 2009. Development and functional annotation of an 11,303-EST collection from *Eucalyptus* for studies of cold tolerance. *Tree Genetics Genomes* 5(2):317- 327. 36 31

Keller G, Cao P, San Clemente H, El Kayal W, Marque C, Teulières C. 2013. Transcript profiling combined with functional annotation of 2,662 ESTs provides a molecular picture of *Eucalyptus gunnii* cold acclimation. *Trees* 27(6):1713-1735

- Lagos C. 2015. Caracterización transcriptómica de la aclimatación a baja temperatura en *Eucalyptus nitens*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Langmead B, Salzberg S. 2012 .Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9:357-359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics,22:1658-1659
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis, G, Durbin R. 2009. The sequence alignment/map(SAM) format and SAMtools. Bioinformatics 25:2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li C, Ng C, Fan L. 2015. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. Environmental and Experimental Botany, 114: 80-91
- LIGNUM. 2018. Domesticación del *Eucalyptus nitens*: Oportunidades y desafíos. Citado el 5/10/18. Disponible en: <http://www.lignum.cl/informes-tecnicos/domesticacion-del-eucalyptus-nitens-oportunidades-y-desafios>
- Lippold F, Sanchez D, Musialak M, Schlereth A, Scheible W, Hinch D, Udvardi M. 2009. AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in Arabidopsis. Plant Physiology, 149(4), 1761-1772.
- Liu Y, Jiang Y, Lan J, Zou Y, Gao J. 2014. Comparative Transcriptomic Analysis of the Response to Cold Acclimation in *Eucalyptus dunnii*. PloS one 9(11):e113091.
- Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. methods, 25(4): 402-408.

- Liu X, Yu W, Zhang X, Wang G, Cao F, Cheng H. 2017. Identification and expression analysis under abiotic stress of the R2R3-MYB genes in *Ginkgo biloba* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3): 503-516.
- Loman N, Misra R, Dallman T, Constantinidou C, Gharbia S, Wain J, Pallen M. 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnology*, 30(5), 434.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. 2005. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant physiology*, 138(2), 1083-1096
- Ogata K, et al. 1996. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat Struct Biol*. 1996;3:178–818. doi: 10.1038/nsb0296-178.
- Ono H, Ishii K, Kozaki T, Ogiwara I, Kanekatsu M, Yamada T. 2015. Removal of redundant contigs from *de novo* RNA-Seq assemblies via homology search improves accurate detection of differentially expressed genes. *BMC genomics*, 16, 1031. doi:10.1186/s12864-015-2247-0
- Pandey A, Misra P, Trivedi P. 2015. Constitutive expression of Arabidopsis MYB transcription factor, AtMYB11, in tobacco modulates flavonoid biosynthesis in favor of flavonol accumulation. *Plant cell reports*, 34(9): 1515-1528
- Pasquali G, Biricolti S, Locatelli F, Baldoni E, Mattana M. 2008. Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant cell reports*, 27(10), 1677-1686.

- Pugliesi C, Salvini M, Fambrini M. 2013. Isolation and molecular analysis of two R2R3-MYB genes from the sunflower (*Helianthus annuus*). *Botany*, 91(10), 731-738.
- Rasmussen-Poblete S, Valdes J, Gamboa M, Valenzuela P, Krauskopf E. 2008. Generation and analysis of an *Eucalyptus globulus* cDNA library constructed from seedlings subjected to low temperature conditions. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(2):56-68.
- Rayko E, Maumus F, Maheswari U, Jabbari K, Bowler C. 2010. Transcription factor families inferred from genome sequences of photosynthetic stramenopiles. *New Phytol.* 188 52–66. 10.1371/journal.pone.0030619
- Robinson M, McCarthy D, Smyth G. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rosinski J, Atchley W. 1998. Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *Journal of Molecular Evolution*, 46(1), 74-83
- Roy S. 2015. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant signaling & behavior*, 11(1): e1117723.
- Segarra G, Van der Ent S, Trillas I, Pieterse C. 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial Microbe. *Plant Biol* 11:90–96

- Shingote P, Kwar P, Pagariya C, Rathod P, Kharte S. 2017. Ectopic Expression of SsMYB18, a Novel MYB Transcription Factor from *Saccharum spontaneum* Augments Salt and Cold Tolerance in Tobacco. *Sugar Tech*, 19(3): 270-282
- Schulz E, Tohge T, Zuther E, Fernie A, Hinch D. 2016. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 6, 34027.
- Shukla P, Agarwal P, Gupta K, Agarwal P. 2015. Molecular characterization of an MYB transcription factor from a succulent halophyte involved in stress tolerance. *AoB plants*, 7.
- Soler M, Camargo E, Carocha V, Cassan-Wang H, San Clemente H, Savelli B, Grima-Pettenati J. 2015. The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytologist*, 206(4), 1364-1377.
- Stracke R, Ishihara H, Hup G, Barsch A, Mehrrens F, Niehaus K, Weisshaar B. 2007. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 50(4), 660-677.
- Stracke, R., Werber, M., & Weisshaar, B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology*, 4(5), 447-456.
- Soneson C, Delorenzi M. 2013. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC bioinformatics*, 14(1): 91
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Fisiologia vegetal*. (Vol. 10). Universitat Jaume I. 1162p.

- Tatusova T, Karsch-Mizrachi I, Ostell J. 1999. Complete genomes in WWW Entrez: data representation and analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(7), 536-543.
- Tao X, Gu Y, Wang H, Zheng W, Zhao C, Zhang Y. 2012. Digital gene expression analysis based on integrated de novo transcriptome assembly of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *PLoS one* 7(4):e36234. doi:10.1371/journal.pone.0036234
- Team RC. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.Rproject.org>.
- Thomashow M. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:571–599.
- Thorvaldsdóttir H, Robinson J, Mesirov J. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics*, 14(2): 178-192.
- Tibbits W, Hodge G. 2003. Genetic parameters for cold hardiness in *Eucalyptus nitens* (Deane Maiden) Maiden. *Silvae Genetica* 52(3-4): 89-96
- Trapnell C et al. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3): 562
- Wang F et al. 2016. AtMYB12 regulates flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Molecular genetics and genomics*, 291(4):1545-1559

Wang L et al. 2006. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26): 9798-9804

Wang N et al. 2017. MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *The Plant Journal*, 90(2), 276-292.

Wang S et al. 2018. SIMYB12 Regulates Flavonol Synthesis in Three Different Cherry Tomato Varieties. *Scientific reports*, 8(1), 1582. doi:10.1038/s41598-018-19214-3

Wang X, Zhao Q, Ma C, Zhang Z, Cao H, Kong Y, Jin J. 2013. Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation. *BioMed Central Genomics* 14(1): 415.

Xie, Z. et al. 2010. Regulation of stomatal lineage cell proliferation by the *Arabidopsis* MYB four lips via direct targeting of core cell cycle genes. *Plant Cell* (in press)

Yang A, Dai X, Zhang W. 2012. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Journal of experimental botany*, 63(7), 2541-2556

Zhang Y et al . 2015. Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato. *Nature communications*, 6:8635

9 ANEXO

Anexo 1. Factores de transcripción MYB de *Eucalyptus grandis*

ID <i>Eucalyptus grandis</i>	MYB	Cromosoma
Eucgr.A00996.1	Myb 3	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A01122.1	Myb 4	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A01648.1	Myb 5	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A01670.1	Myb 6	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A01766.1	Myb 7	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A01767.1	Myb 8	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A01772.1	Myb 9	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A02110.1	Myb 10	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A02150.1	Myb 11	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.A02796.1	Myb 12	Chr A (40.3Mb)
Eucgr.B00023.1	Myb 13	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00229.1	Myb 14	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00300.1	Myb 15	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00301.1	Myb 16	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00373.1	Myb 17	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00502.1	Myb 18	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00865.1	Myb 19	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B00866.1	Myb 20	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B01827.1	Myb 21	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B01869.1	Myb 22	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B01964.1	Myb 23	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B02144.1	Myb 24	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B02197.1	Myb 25	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B02896.1	Myb 26	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03006.1	Myb 27	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03324.1	Myb 28	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03417.1	Myb 29	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03606.1	Myb 30	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03684.1	Myb 31	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03941.1	Myb 32	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.B03985.1	Myb 33	Chr B (64.2Mb)
Eucgr.C00190.1	Myb 34	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00624.1	Myb 35	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00721.1	Myb 36	Chr C (80.1 Mb)

Eucgr.C00722.1	Myb 37	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00723.1	Myb 38	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00724.1	Myb 39	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00725.1	Myb 40	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00826.1	Myb 41	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C00947.1	Myb 42	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C01374.1	Myb 43	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C02096.1	Myb 44	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C02280.1	Myb 45	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C02391.1	Myb 46	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C02893.1	3RMyb	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C03151.1	Myb 47	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C03152.1	Myb 48	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C03153.1	Myb 49	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C03554.1	Myb 50	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C03555.1	Myb 51	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.C03699.1	Myb 52	Chr C (80.1 Mb)
Eucgr.D00037.1	Myb 53	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D00040.1	Myb 54	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D00042.1	Myb 55	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D00044.1	Myb 56	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D00050.1	Myb 57	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr-D00751.1	Myb 58	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D01701.1	Myb 59	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D01819.1	Myb 60	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D02014.1	Myb 61	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D02099.1	Myb 62	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D02271.1	Myb 63	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.D02390.1	Myb 64	Chr D (42.0 Mb)
Eucgr.E00175.1	Myb 65	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E00261.1	Myb 66	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E00407.1	Myb 67	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E01031.1	Myb 68	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E01581.1	Myb 69	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E02958.1	Myb 70	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E03689.1	Myb 71	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.E03819.1	Myb 72	Chr E (74.7 Mb)
Eucgr.F00002.1	Myb 73	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F00031.1	Myb 74	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F00325.1	Myb 75	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F01069.1	Myb 76	Chr F (53.9 Mb)

Eucgr.F02207.1	Myb 77	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F02372.1	Myb 78	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F02583.1	Myb 79	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F02756.1	Myb 80	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F02842.1	Myb 81	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F02864.1	Myb 82	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F03143.1	Myb 83	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F03175.1	Myb 84	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F03176.1	Myb 85	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F03656.1	Myb 86	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F04277.1	Myb 87	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F04422.1	Myb 142	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.F04423.1	Myb 88	Chr F (53.9 Mb)
Eucgr.G01774.1	Myb 1	Chr G (52.4 Mb)
Eucgr.G02195.1	Myb 89	Chr G (52.4 Mb)
Eucgr.G02492.1	Myb 90	Chr G (52.4 Mb)
Eucgr.G02522.1	Myb 91	Chr G (52.4 Mb)
Eucgr.G03183.1	Myb 92	Chr G (52.4 Mb)
Eucgr.G03385.1	Myb 2	Chr G (52.4 Mb)
Eucgr.H00158.1	Myb 93	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H01058.1	Myb 94	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H01337.1	Myb 95	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H02226.1	Myb 96	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H02896.1	Myb 97	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H03057.1	Myb 98	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H04082.1	Myb 99	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.H04157.1	Myb 100	Chr H (74.3 Mb)
Eucgr.I00012.1	Myb 101	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I00442.1	Myb 102	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I00663.1	Myb 103	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I00828.1	Myb 104	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I01406.1	Myb 105	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I01698.1	Myb 106	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I01782.1	Myb 107	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I01791.1	Myb 108	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.I02017.1	Myb 109	Chr I (39.0 Mb)
Eucgr.J00250.1	Myb 110	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01343.1	Myb 111	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01362.1	Myb 112	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01553.1	Myb 113	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01555.1	Myb 114	Chr J (39.4 Mb)

Eucgr.J01569.1	Myb 115	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01573.1	Myb 116	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01574.1	Myb 117	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01576.1	Myb 118	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01578.1	Myb 119	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01580.1	Myb 120	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01586.1	Myb 121	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J01601.1	Myb 122	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J02212.1	Myb 123	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J02217.1	Myb 124	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J02279.1	Myb 125	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J02816.1	Myb 126	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J02817.1	Myb 127	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.J02819.1	Myb 128	Chr J (39.4 Mb)
Eucgr.K00077.1	Myb 129	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K00153.1	Myb 130	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K00251.1	Myb 131	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K00555.1	Myb 132	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K01542.1	Myb 133	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K01545.1	Myb 134	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K02297.1	Myb 135	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K02470.1	Myb 136	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K02806.1	Myb 137	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K03010.1	Myb 138	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K03130.1	Myb 139	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K03262.1	Myb 140	Chr K (45.5 Mb)
Eucgr.K03562.1	Myb 141	Chr K (45.5 Mb)

Fuente: Soler et al.2015

Anexo 2. Secuencias nucleotídicas y peptídicas de los factores de transcripción MYB-R2R3

Gen	Secuencia nucleotídica	Secuencia peptídica
EucniMYB37	<p>>Eucni.MYB37</p> <p>GTAGAAAAGTTGCCAGAAATCAAAGAC ACGAGCGTTCACAACTCTACAAGAA CACACAGAGAGGGAGAGAGAGAGTTG CAGCAATGGGAAGGAGCCCATGCTGCT CAAAAGACGAAGGGTTGAACAGAGGG GCTTGGACTGCTGATGAAGACAAGAGA CTCACGGACTACATCAAAGTTCACGGG GAAGGGAAGTGGAGGAACATTCCAAA AGAGCTGGTCTCAAGAGATGTGGGAAG AGTTGCAGGCTGAGGTGGTTGAATTAT CTGAGGCCTGACATCAAGAGAGGCAAC ATCACCAGTGATGAAGAAGACCTCATC ATTAGGCTTCACAGACTCTTGGGTAAC CGATGGTCTCTCATTGCGGGAAGACTT CCAGGGCGAACAGACGATGAAATAAAA AACTACTGGAAGTCATGTCATTGGCCA AGAGGGAACAAGGAGAGAAGAAGCCA AGCCTCTCCAACAAGTGAAGATCAA CCGATGGTACCTCCTCAATAATGCAG GACGAGACTCAGAACTGGTGTAGTTG GAGACTCCACGCTCCACCACATGGAAC AGCCATCGGGGACCAGTGAGGCGGCA AAGAGCGGGCAATCGTCAGAGTATGAA TCAAGCGACGTCTCATCGCCGGCTTCC ATGTCCAGGGAAGAGCCAATTGGAGC AGCTCATGGTGGACTGCACTGTCGGGG AGTTGGACCTCGTGGAGATTCTGACG GTTCTGATTTTAGGCTCAGCGAGTCTG GAAATACTTCTCAAGTGATGAACACGGT TGATAATGAGGGTATGAGCAAGAACGA AAATGTCGGAGGTAATCCTATGGACTT GCACATAACTGGTGGAGTGAAGGATTG GAGATGGATAATTGGGTCTCCGACCTC GCCGAGATGACCTCGGGTTTGGGACCT TTCGCTTCGATCCTATATGGCGAAGATT GGATCCCGTAGATTGAACGCTGCTTATT TGAGAATAATTTGAAGTTCCTGAAAAG GGTTCTTCTGGAAGTGCACACCTATCC AATGTATATGTGACCTTACTGTCGCAA TAATCTTTGACATAGTCAGAAGGTGTAA</p>	<p>>EucniMYB37</p> <p>KSCQKSKTRAFTNSHKNTQRGRERV AAMGRSPCCSKDEGLNRGAWTADED KRLTDYIKVHGEKWRNIPKRAGLKR CGKSCRLRWLNLYLRPDIKRGNITSDE EDLIIRLHRLGNRWSLIAGRLPGRTD DEIKNYWKSCHWPRGNKERRSQASP TTEKINRWSPQ</p>
EucniMYB41	<p>>Eucni.MYB41</p> <p>GCACAGATGTTGCAAGCTCAAAAAGTTTA ATCCTTCTTCAAATTTCTTTTGCATAAT TAATTGCAGTGGGGTAACTTTTGAACCT AGAGAGGTCCACATGTTCCGGAAGCTCT TGCTTGTCAGTACAGGTTTGGAGCTGGT ACTGGATAACATTGTCGTTAGATAGCAA AGTCTGGTTGTAGATCCGCATGTTTATT TCTGAAATTGAACAATTTTGTAGAGGAG GTGGGATCATAAATAACATCGAGAAGT CCAAAGTTTACTTCAATGTCCTCTATA TTCTTAGATATATGTACCTTGGTGTTTT GTCACAGTCCGGCTGCCTACAAAAGCTT GCAAGAGAAAGCGCTTAAAAAGCAGGA AAAGGACCATGACAATGATGATGAAAA</p>	<p>>EucniMYB41</p> <p>HREVQSLTSMSSIFLDICTLVFCHSRL PTKACKRKRKLSRKRTMTMMMKTRIQ TTRSPCCSKEGLNRGAWTAQEDRILT NYIKAHGEGRWRNLPKAGLQRCGK SCRLRWLNLYLRPDIKRGNISPDQEELI RLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKN YWNTNLGRKVQSNTPTNSQSRSGHV DQSSPNHQRRDDRPRKVKSPKHSET SKMSTADNSASESPSSKPDARLVWR TKCVQVLQGPHRPTTRTRTSPK</p>

	<p>CAAGAATACAAACAACAAGAAGCCCTT GTTGCTCCAAGGAGGGCTTGAACAGAG GAGCGTGGACGGCTCAAGAAGACAGG ATCCTCACCAACTACATCAAGGCTCAC GGCGAGGGCAGGTGGAGGAACCTCCC CAAGAAAGCAGGGTTGCAGAGATGTGG CAAGAGTTGCAGGCTGCGATGGTTGAA CTACCTGAGGCCGGACATCAAAAGAGG CAACATATCTCCCGATCAGGAAGAGCT CATCATCAGGCTTCACAAGCTTTTGGG GAACAGATGGTCTCTGATAGCTGGGAG ACTTCCAGGGCGAACAGACAATGAAAT AAAGAACTACTGGAACACCAACTTAGG CAGGAAGGTCCAGAGCAATACCCCAAC CAACTCCCAATCTCGCAGTGGTCATGT CGATCAATCATCCCCAATCATCAACGT GACGATGATCGACCCCGCAAAGTAAAG AGCCCGAAACATTCCGAGACATCGAAA ATGTCTACTGCCGATAATAGTGCCTG AGTCGCCATCAAGTAAGCCCGATGCTC GTTTGGTCTGGAGGACCAAATGCGTTC AAGTGTCCAAGGTCCTCATCGTCCCA CCACCAGAACAAGAACTTCACCGAAAT GAAGATCCTATCAACACGGACTTTGCA GCATCAGCAGCAGTGGCCCCGGCTCC CACCGGGTCTTGCCGCCATTCACGGC GAATATTCCGGCGGATCTGTGATGGA TGACTTTGAGATTGGGGATATCTGCTTG TCAGGGTTCCTGAATTCGGACATATCG AGCATCGCTAACCAAGGTCAATCAAC AGCAATAACAGCATCACGATCAGTGAC GATCTGTTGCTGATCATAGCCAAGTG CAAGGTCTGGGGTTGGGCAGCACTGA GCAGTGACAGTGTTCATGATAATCATCA AGCAAATGCTGGTCCCAACTTCCATCA GGCTTTTGCCTCCTTTCTTGACTATAAT GGAGGAGACCAGTGGCTTTGAGCAGG ACATGAGAAGTGTACCACATCGTCAAG GAGCCATTTTTCATACAAGAATTTGCAT ATAGGGACACACTAGGCCGTCCCCGCT GTTGATGATTCTTTCTTTTGTCTTTT TTTGTATGTTGTTGCTGCGGATCACTC TGTTTATTCACTCAATAGTCTTGAGCT TTCTGAGCTTGATCCGTGAAATTTTGA ATAGACAAGAAGCACATGCAAAA</p>	
EucniMYB64	<p>>Eucni.MYB64 TCCCGAGACGAAGGGAAGAACGCTGG AGGAGATTCAGTCTCATTTAGATGATC GGTTTTGCAAAAGCTTTTTCGCAATCGA TCCTAAATATTCAAAGGGCTATTACAGG CGGGGTGCAGCTTATCTTGCCATGGGG AAATCAAAGATGCGCTCAAGGATTTTC AGCAGGTTAAAAGACTCTGTCCGAATG ATCCTGAGCCTCTCTTTTCCCCCTATTG GCAATTCGTAAGCTGTCTTCCCGCGT TCCTTTATAGGAACCCAGCATAACATCCA ATTTTTTCGCAAGGCGGTCCGTAAACTT AAAAAGGCCGGCAGCCTTCTGTTGGTT CGTGCTCGAAAAGAGTACGCCGATCAT GCCACTCGCTGCAATTGGATGTGCCCT GCTGACATCTTGTGCGAGTTGACCCATT GTTGAGAGAGACGGAGAGACGGGAAT</p>	<p>>EucniMYB64 MGRAPCCAQVGLHRGPWTPREDSLL VNYIQAHGEGHWRSLPKKAGLLRCKG SCRLRWMNYLRPDIKRGNIPTDEDDLI IRLHSLGNRWSLIAGRLPGRDNEIK NYSFTHLSRSSQLLRNQDNHPTHRPP STKRRKTTAKSTKESTKKSQVHNNKK SPNRASAEATEKPKVHLPKAIKRVTSF SLPRNDSFDCNTAISWSSSQGGLLDR EVAHVARSDETAGLYGFFVGDQPDR GHHEFFNGANDDSTANPHRLECPSE EEPEKIRTGRSRISTRNICSSSDGDDL VQLDSFAESLLM</p>

	<p>GGGGAGGGCTCCTTGCTGTGCGAAGG TCGGATTGCACCGGGTCTTGACTC CTAGAGAAGACTCATTGCTTGTAACTA TATTCAAGCACATGGCGAAGGCCATTG GAGATCCCTCCCTAAGAAAGCTGGGCT TCTGAGGTGCGGAAAGAGCTGCCGACT TAGATGGATGAATTATCTGAGGCCGA CATCAAGAGGGGCAACATAACTCCGGA CGAGGACGATCTGATCATCAGATTGCA CTCCCTTCTCGGCAACCGCTGGTCTCT CATTGCCGGTAGGCTCCCTGGCCGAAC CGATAACGAGATAAAGAATTACTCATT ACCCACCTCAGCAGAAGTTCTCAGCTC CTGAGAAATCAAGACAATCACCCGACC CATCGTCCACCCTCCACTAAGAGGAGG AAAACGACCGCCAAATCCACTAAAGAG AGCACCAAAAAATCGGTGCAGCACAAC ACAAGAAGAGCCCTAATAGAGCATCC GCGGAGGCCACGGAGAAGCCCAAAGT TCATCTTCCCAAGGCCATTAGGGTTACT ACGTCCTTCTTTTACCTAGAAACGACA GTTTCGATTGCAACACTGCGATTAGCTG GTCCTCCAGTCAAGGAGGGTACTTGA CAGAGAAGTGGCTCATGTTGCCAGGTC AGATGAACTGCAGGGCTATACGGCTT CTTTGTTGGTGATCCGCAAGATCGCGG TCACCATGAATTTTTTAACGGTGCAAAT GATGACAGTACTGCCAACCTCATCGT CTTGAGTGCCCATCCGAAGAAGAACCA GAAAAGATCAGAACGGGACGCTCGAGA ATCTCTACGAGGAATATCTGCAGCTCCT CGGACGGGGATGATCTTGTTCAGCTGG ACTCTTTTGCTGAGTCGTTGCTGATGTG AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGAGAGAGAGAGATGTTTCAAGCCATG CAGGCCAAGCGCGTCAAAATCAAATGG GCGTTTAGGTTTACACTGTGGTTTTGAA TCGTAGATCCACAAAACACGTGCTTAC CTTCTGGCCAAACTCGGGGACCTCGGA TGCCTTTGTAAGTTCTCAAATATGAGA ACGGCCACCTCTTGTAGATTTTCCATCC CCCCTGTACTTTCTAGGGTTTTGTTAAA TGTATATGATGCCTATTCAAATTTTCTC CAAATCCTATGATGTACTTTCAAGGTTG CTGAACAAGATGGA</p>	
<p>Euclni.MYB68</p>	<p>>Euclni.MYB68 ATTGCTGGTTTGAGAGAAATGTTCCATG CATCCTGATGCAAGATTTTAAGACGGC CCATTTACAGCTCACATCCCCTCGAGC GATGTTTCTCAGCCAGGTCATAGGCAC AGCCATAGGATGCGTGGTGGCTCCCTT AAGCTTCTTCTATTCTACAAGGCGTTT GATGTGGGCAATCCTGATGGAGAATTC AAAGCGCCGATGCTCTGATCTACAGG AACATGGCGATCCAGAGAAGCCAAAAG CATGGGAAGAGCACCATGCTGTTCTAA GGTGGGTTTACGTAGAGGGCCTTGAC GAACAAAGAAGACACGGTCTTGTCAA GTACATTCAAACGCATGGAGAAGGTCA TTGGCGATCCTTGCCTAAAAAAGCAGG GTTGCTGAGATGTGGGAAAAGCTGCAG GCTGAGGTGGATGAACTATCTGAGGCC</p>	<p>>EuclniMYB68 MGRAPCCSKVGLRRGPWTNKEDTVL VKYIQTHGEGHWRSPLPKKAGLLRCGK SCRLRWMNYLRPDIKRGNIPTDEEDLI MRLHALLGNRWSLIAGRLPGRDNEI KNYWNHLSKRVATDSNENHSHKGLR GPKKRSNNNLIANKKKRSEKSPQE DRFLQQLKLDCKRKTLLQALIFLRDLE GGGVEDLVLRWLQWEA</p>

	AGACATAAAGAGAGGGAACATCACTCC GGATGAGGAAGACCTCATCATGAGGCT TCATGCCCTCCTCGGAAACCGGTGGTC GCTGATCGCTGGGCGACTGCCGGGCC GAACCGACAATGAAATCAAGAATACT GGAAGTGCACCTCAGCAAGAGGGTC GCTACCGACAGCAATGAAAACACAGC AAGGGACTGAGAGGCCAAAGAAGAG AAGCAACAACAACCTCATCGCCGCCAA CAAGAAGAAGAGGGCGGTACAGAGA GCCCTCAGGAAGATCGATTTCTGCAAC AACTCAAGCTCGACTGCAAGCGCAAAA CCCTTCTCCAAGCTCTCATCTTTCTACG CGACCTCGAAGGAGGAGGTGTGGAAG ATCTTGTCTACGGATTTGGCTACAGTG GGAAGCCTGAGAGCAACAATGGCTTGT ATGGCTGTGGAGTTTATTTTTCTCCTGA TAGCCATCCGCTCGAAAGCGTTAAGTC CGCCCCTAGAGATGAAGACGGCCTAAG GCATCTGTTGCTTTGCCGGTCAATTG GGTAAACCAGAGCTTGTAGTCTGGC TCGGAACAATCTCATCTGATAG	
Eucni.MYB73	>Eucni.MYB73 CGTCGAGGAAAAGAGATATAAGAATCG CGTCTTTCGAATGGCGGATTCCAAAGT CCGGGACGCGTCCGCCTCCTCGGTGC TCCACGGGAAGTACGAGCTCGGCCCTT TTCTGTTGCATAGTCGTAGTTTTCGGCC AGGGGTTCTATTCGGTATACGTAGAGA AGTCAGTGGGCGAAACCGAGCGTCTGA GCGGTCCGCCATGGCTTCTTCTTCTC TGAGCTTCCGCGAGGAAGGACGCGG ATCGGATCAAGGGCCGTGGAGCCCCG AGGAGGACGAGGCGCTGCAGAGGCTG GTCCAGAGCTACGGCCCCCGCAACTG GTCCCTGATCAGCAAGTCCATCCCGGG GCGGTCCGGCAAGTCGTGCCGGCTCC GGTGGTGCAACCAGCTCTCGCCCCAG GTGGAGCACCGCCCCTTACCACGGA GGAGGACGAGGCCATCGTCCGCGCCC ACGCCAGGTTCCGGCAAGTGGGCCACC ATCGCTCGCCTCCTCAACGGCCGCACC GACAACGCCGTCAAGAACCACTGGAAC TCCACCCTCAAGCGGAAGTGCTCCGGT CCCTCGGCCGGCGGGCAGCAGCCGCTCA CGCCCTCGCGGAGCAGCAGCCGCTCA AGCGATCGGCCAGCCTCGGGACGCCC ACGGGCGGCAACAACGCCGTCTCCGA TCTGTTCTTACGCCGAGCAGCCCCTCG GGAGTCGGACCTGAGCGACTCGGG	>EucniMYB73 SRKRDIRIASFEWRIPKSGTRPPPRCS TGSTSSALFCCIVVVFQQGFYSVYVEK SVGETERRAVGHGFLFFCSFREEGR GSDQGPWSPEEALQRLVQSYGPR NWSLISKSIPGRSGKSCRLRWCNQLS PQVEHRPFTTEEDAIVRAHARFGKW ATIRLLNRTDNVKNHWNSTLKRK CSGPSAGGDDADALAEQQPLKRSAS LGTPTGGNNAVSDLFFSRAAPRESDL SDSG
EucniMYB79	>Eucni.MYB79 GATGCATCCGGGTCAGAACC GTT CAGC AACAAAAGACAAGAGCAACTTCTTAAAT CCTCAGGATGATCTCGCTTTCAAGCTTG AGTATGTGCACCCATATCTGGATGGAG TGACTAATCCACGCMATCAATCAAGCT CAAGCACCATCACCTCAAGAAGAAGGA AAGAAAGAGAGAAGGACCGGAGACCC GACAGAGGGTCGCGCGCGCACGAGAC ATGGGACGATCCCCTTGCTGCGAGAAG GCGCATACCAACAAGGGCGCGTGGAC CAAGGAAGAGGACCAGCGCCTCATCGA	>EucniMYB79 STXSIKLLHHHLKKKERKREGPETRQ RVARARDMGRSPCEKAHTNKGAWT KEEDQRLIDYIRLHGEGCWRSPLSCR ASQVRQELQLRWINYLRPDLKRGNFT EEEDELIKHLIKN

	CTACATCCGCCTCCACGGCGAAGGTTG CTGGCGCTCCCTCCCAAGCTGCCGGG CTTCTCAGGTGCGGCAAGAGCTGCAGC TCAGGTGGATAAACTACCTCCGCCCG ACCTCAAGCGCGGCAACTTCAACGAGG AAGAAGACGAGCTCATCATCAAGCTCC ACTTAATCAAGAAC	
EucniMYB82	>Eucni.MYB82 AGTTTTCTTGGTGGCCTAGCTTTTCAA GTATTGCTTGAATTGCATAGAAATAGA AGGTTGAGAGGTGAGGAGGGGTTGGT GAGAGAGAACATCTCGACAAAGAGGGA ATAAAGCTTTGTCTCTTGTTCCTGTTT TTGGTTTTTGGTGGCGCATCGCAGAG AAAAAGGGAGAGGGAGAGCCGAAGAA TGGGAAGACAACCGTGCTGTGACAAAG TTGATTGAAGAAAGGGCCATGGACAG CTGAAGAGGACAAGAAGCTCATCAACT TCATCCTCACCCATGGCCAATGCTGTT GGCGGGCTGTTCCCAAGCTTGCAGGA CTGCTGCGGTGTGAAAGAGTTGCAGG CTGAGGTGGACCAATTACCTGAGGCCA GACTTGAAGAGAGGCCTTTTGTCCGAG TATGAAGAGAAAATGGTCATTGACCTCC ATGCGCAACTTGGCAACAGATGGTCGA AAATAGCCTCTCACCTCCCGGAAGAA CAGACAATGAGATCAAGAATCACTGGA ACACTCACATCAAGAAGAAGCTCAAGA AGATGGGCATTGATCCTCTCATCAAA GCCATTAGTCACCAACAACGACAACAC AACCGATCAACAACCCCCCAAGCAGC CCAGA	>EucniMYB82 GGVGEREHLDKKEGKLCLLFPCFWFL GGRSQRKRERESRRMGRQPCCDKV GLKKGPWTAEDKKLINFILTHGQCC WRAPKLAGLLRCGKSCRLRWNYL RPDLKRGLLSEYEEKMVIDLHAQLGN RWSKIASHLPGRTDNEIKNHWNTHIKK KLKKMGIDPLITSH
EucniMYB142	>Eucni.MYB142 AAAAAATGGAGGGTAGGATTAAGAAGA TTAACAAAGGAGCATGGACTGCGGAGG AAGACAGAAAATTAGCTGAGGTCATTG CAGTTAGCGGAGCTAGAAGATGGCAGG CCGTTGCAGCTAAAGCAGGCTTGAATA GGAGTGGCAAGAGTTGCAGACTAAGAT GGATGAATTATCTGAGGCCCAACATAA AGAGAGGCAACATTTAGACCAAGAAG AGGATTTGATACTTAGGCTTACAAGCT CCTCGGAAATAGGTGGTCTTTGATTGC AGGGAGATTGCCAGGACGGACAGATAA CGAGATCAAGAACTATTGGAATTCTCAT TTGAGCAAGAAAATTGATAACCGAAAG GAGAAACAAATTAGTCAAGCTTCGAGT GAAGGGGATGAGATGGAACAGGTAAGA GAATTAGAAGAGAAGAAATCATCAGAG AGTAGTGAAGACCACTTAAAAGCCATC GCCAGCTTTGATATGGATGATCTCTTCG ATTTCTCCATGAGAACCCCTCTAAATCT CGGCTGGCCAAGCGAGTTTCTTCTGTC GGAGGACGACAATGGTCTGAAAGGATT AGCTGCTAGCTAATTCTCCCGTTGAGC ATCATATTGCTTAAGGTTTCATCATCTA GCTGCTGCAGGAAGCAGAGAAAGCCAT GCAAGGCCTGGAGATTAAGCCTA	>EucniMYB142 MEGRIKKINKEAWTAEDRKLAEVIAV SGARRWQAVAAKAGLNRSKSCRLR WMNYLRPNIKRGNISDQEEDLILRLHK LLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWN SHLSKKIDNRKEKQISQASSEGDME QVRELEEKSSSESSEDHLKAIASFDM DDLDFFSMRTPLNLGWPSEFLLSEDD NGLKGLAAS
Eucni.MYB99	>Eucni.MYB99 AGGTGAAAGGAGAGTAACCATAAACTC GTTTTAGTFACTCTTTTCATCAAGACGTTT CTATTGAACTCTCCAAATCAACAACCTCA	>EucniMYB99 LDCVVFVQHITHSKSMLVFATTDSTGL KRTGKSCRLRWLNLYLRPDVRRGNITL EEQLMILELHSRWGNRWSKIAQHLPG

	<p>GATAATTTGCCGTATATGACTCCATATG CAATGATACAGAGATGTTCAAGTAATTA GATTGTGTAGTTTTTGTCCAACATATTA CGCATAGCAAATCAATGCTCGTGTGTTG CGACGACGGATTCAACAGGTTTGA AAC GGACCGGAAAGAGTTGCCGGCTGCGG TGGCTGAATTACCTCCGCCCGACGTT CGGCGGGGAACATAACCCTCGAAGA GCAGCTCATGATCCTTGAGCTCCATTCT CGCTGGGGCAATCGATGGTCAAGATC GCGCAACACTTGCCGGGCAGGACCGA CAACGAGATCAAGA ACTACTGGCGAAC CCGGGTGCAGAAGCACGCGTTTTGTAA GTTTAAATGGTGTGCCTCCGCATGTAAA TACAAAGGT</p>	<p>RTDNEIKNYWRTRVQKHAFCKFKWC ASACKYKG</p>
Eucni.MYB108	<p>>Eucni.MYB108 GGACTGTGGAGGAGGACAAGATCCTCA TGGACTATGTAACAGAACATGGAAAAG GAAAGTGGAAATCCATAGCCAGGAGGAC AGGCTTGAGAAGATGTGGCAAGAGTTG CAGGTTGAGGTGGATGAATTACCTGAG CCCAGACATCAAACGAGATCACTTTACT GAGGAAGAAGAAGACCTCATTGTTAGA CTCCATAATTTGTTGGGCAACAGGTGG TCTTTGATTGCGAAACGGGTGCCTGGT CGAACGGATAATCAAGTGAAGAACTAC TGGAACACTTATTTGAGCAAAAAGCTG GGCATCAAAAAGCAAATTTGTCAAGTC GGGAGAACAAAATCTAGGATCTTGCAT ATTTCTGAGAGTTCAACACATAAGGATT CTATTTACCTTGTGCTGGCAACAGCA GGTCTTCGGAAATGAATGTGGACAAGA GTCCGGAATCCCAAGAGACATTGGACC TGCCGGAGTTGACGAGCAAAGAAGAGT ATTCCACCCCTCTTTCTGGGATTTTGA ATCCGATTTAGAGATGAATCTTAGCATG ATGGAGTTTCTGGATGGACATTCTTTC CTTCTATTAGCATCATCCAAGGGTATT TTCTTATTAGTCTATCTGTTGAATTTGGA GCATAGAGCTGCTCAA</p>	<p>>EucniMYB108 DCGGGQDPHGLCNRTWKRKVESIAR RTGLRRCGKSCRLRWMNYLSPDIKR DHFTEEEEDLIVRLHNLLGNRWSLIAR RVPGRTDNQVKNYWNTYLSKKLGIKK QICQVGRTKSRILHISESSTHKDSISPC AGNSRSSEMNVDKSPESQETLDLPEL TSKEEYSTPSFWDFESDLEMNLS MMEFLDGHSLPSY</p>
Eucni.MYB136	<p>>Eucni.MYB136 GCCTCTCTCCTCTCTATATATATAGG AACCACGCAAGCAGACAGGCAAAAAGC TTGGCTCCAAGCTATCTCAAGTCTCATC GGTAGCAAAAATCAACGAAGAACTACT CGTGCTCAAGACATCGGAGGGGTTGGA GAGAGGGAGAGATGGGAAGACCGCCG TGCTGTGACAAGACTGGAGTGAAGAAA GGGCCGTGGACACCGGAAGAAGATAT CGTGCTGGTGTCTTACATTCAGAGCAT GGGCCTGGGAATTGGAGATCTGTTCTC ACTAACACAGGTTTGTTCAGATGCAGC AAGAGCTGCAGGCTCAGATGGACTAAT TACCTCCGTCCAGGTATCAAGCGCGGT AGCTTACGGACCAAGAGGAAAAGATG ATCGTCCACCTTCAGGCTCTTCTTGTA ATAGGTGGGCGGCCATAGCTTCGTACC TTCCTCAGAGGACTGACAATGATATCAA GAACTACTGGAATACCCACTTGAAGAAT CAGCTGAAGAAGCTTCAAGGCCAAGCA AATCCTGATGATGATGACCATAATCATC ACCCACAAGGGTTCAACGCAACTTAC</p>	<p>>EucniMYB136 QKSTKNYSCSRHRRGWREGEMGRP PCCDKTGVKGPWTPEEDIVLVSYIQ EHGPGNWRSVPTNTGLFRCSKSCRL RWTNYLRPGIKRGSFTDQEEKMIVHL QALLGNRWAAIASYLPQRDNDIKNY WNTHLKNQLKKLQGGANPDDDDHN HHPQGFNATSHSNPKGQWERKLQTD IHTAKQALYEALSDNQHSFLNETTTA LGDGGVCDRPPHQESSYASSTKNIA RLLEGWMKSSPISGKIKVETAARSANV SNKMAAAAGSRSTSEGGVAGVATPE CLDSLFSFNSSNSDVSQSVSADENNV NLTPESTIFQEEKPRLESNDNHQVP IKLLEKWLDDAAAQALQDDYLMDMA LDQDALF</p>

	<p>ACTCCAATCCCAAGGGCCAGTGGGAGA GGAAGCTCCAAACCGACATTCACACGG CCAAACAAGCCCTCTATGAAGCCTTGT CATTGGACAACCAACATAGCTTTTTGAA TGAAACGACGACAGCACTTGGTGACGG CGGCGGTGTTTGCACAGACCGCCGC ACCAAGAATCAAGCTACGCATCGAGCA CCAAGAACATAGCAAGATTGCTCGAAG GATGGATGAAGAGCTCGCCGATATCAG GGAAGATCAAAGTGGAAACTGCCGCC GCTCTGCAAATGTTTCTAACAAGATGGC TGCCGCTGCAGGTTTCGAGGAGCACTAG CGAAGGCGGCCTTGCTGGCGTGGCAA CCCCAGAGTGCTTGGACTCGCTCTTTA GCTTCAACTCCTCGAACTCTGACGTGT CTCAATCGGTGTCGGCAGACGAAAACA ACGTCAATTTGACGCCGGAGACGAGCA CGATTTTCCAAGAGGAGAGCAAGCCGC GCTTGGAGAGTAATGATAATCATCAAGT GCCAATAAAAGTTGCTTGAAAATGGCT GCTTGATGATGCTGCAGCTCAGGCACT ACAAGATGATTACCTCATGGATATGGCA TTAGATCAGGATGCTTTGTTCTAACTCA ACTAGATCTCAATTAGGGAAATGATCAA TTCTTGATGGGCAAGGTCCTATTGAA GGGAAATTCAGGTTTAAATCATGTTCT GTGATTGATCCTGATAGCATTGGACCTA GTCTATGCAAGAATTTGGCTAGTTAGGA AGACTCTTTGTTTGTCTGTTGATGTTTAT CGTATAGGTCTCAAGCTGTTTTCTGGC TGAAATCACGCTTGTTTTGAGCCGATAA CTGTGATAAATATCCCTTTCTAGAAGA TAACGAAGCAAAGTGCAAAATTGATGT GTAATGTAATTTTGTTCACCTTATTATCAA TAGGAGACAAATAAGTATGTGCCTTTAC AAGAAAAATCAGCTGCGCAAGAA</p>	
--	---	--

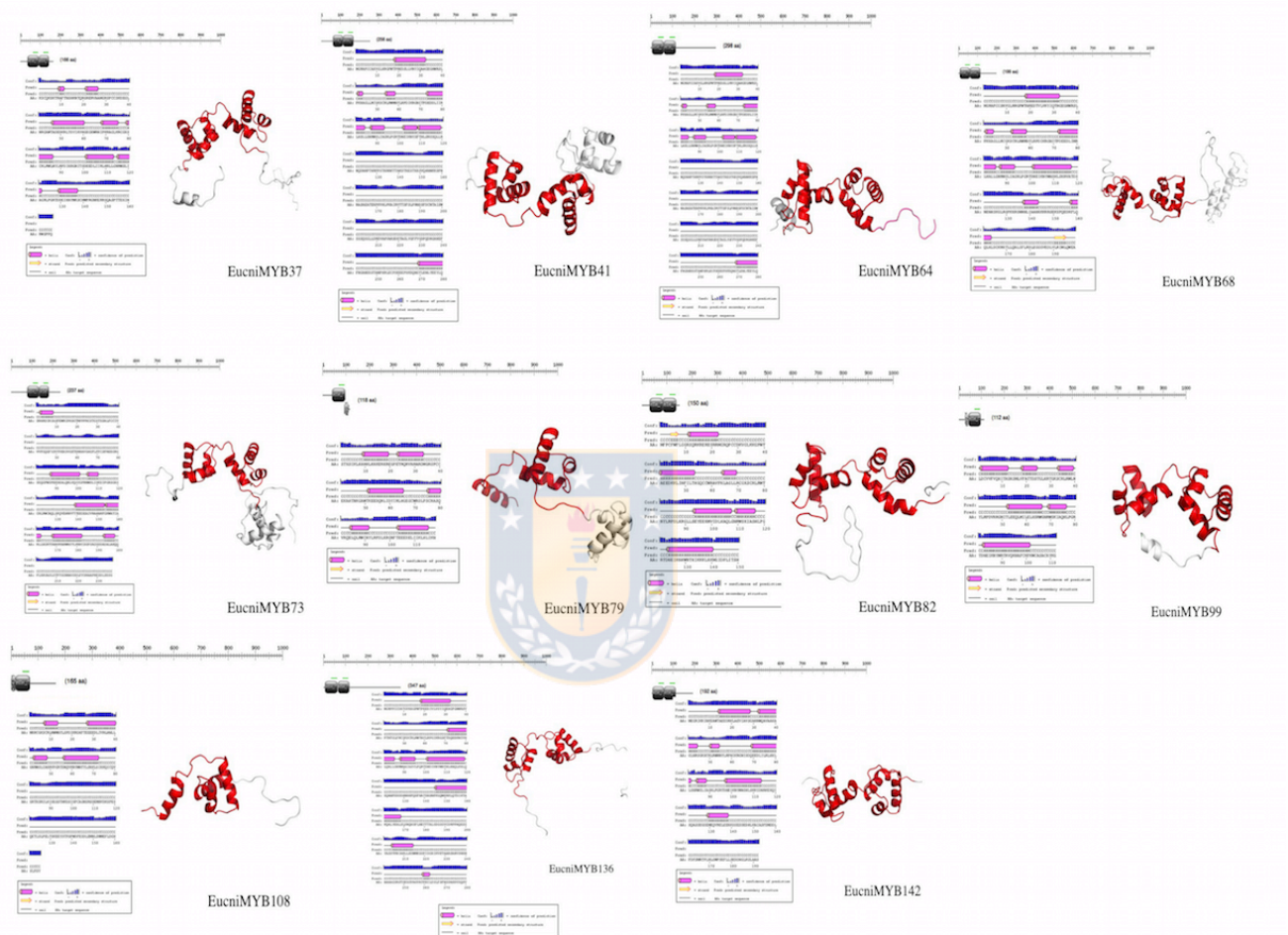
Eucgl.MYB64	<p>> Eucgl.MYB64</p> <p>TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCA ATACTCGACGCACCTCCCTGAGCCTCT CTTTTCCCCCTATTGGCAATTCGTAAGC TGTCTTCCCGCCGTTCTTTATAGGAAC CGACGTAACATCCAATTTTTTCGCAAGG CGATCCGTAACCTAAAAAGGCCGCA GCCTTCTGTTGGTTCGTGCTCGAAAAG AGTACGCCGATCATGCCACTCGCTGCA ATTGGATGTGCCCTGCTGACATCTTGTC GCAGTTGACCCATTGTCGAGAGACGGA GAGACGGGAATGGGGAGGGCTCCTTG CTGTGCGAAGGTCCGATTGCACCGGG GTCCTTGGACTCCTAGAGAAGACTCAT TGCTTGTTAACTATATTCAAGCACATGG CGAAGGCCATTGGAGATCCCTCCCTAA GAAAGCTGGGCTTCTGAGGTGCGGAAA GAGCTGCCGACTTAGATGGATGAATTA TCTGAGGCCCGACATCAAGAGGGGCAA CATAACTCCGGACGAGGACGATCTGAT CATCAGATTGCACTCCCTTCTCGGCAA CCGCTGGTCTCTCATTGCCGGTAGGCT CCCTGGCCGAACCGATAACGAGATAAA GAATTACTGGAACACCCACCTCAGCAA AAGGCTCCTGAGAAATCAAGACAATCA CCCGACCCATCGTCCACCCTCCACTAA GAGGAGGAAAAACGACCGCCAAATCCAC TAAAGAGAGCACCAAAAAATCGAAGCA CAACAACAAGAAGAGCCCTAATAGAGC ATCCGCGGAGGCCACGGAGAGGCCCA AAGTTCATCTTCCAAGGCCATTAGGG TACTACGTCCTTCTTTACCTAGAAA CGACAGTTTCGATTGCAACTGCGAT TAGCTGGTCTCCAGTCAAGGAGGGTT ACTTGACAGAGAAGTGGCTCATGTTGC CAGGTCAGATGAAACTGCTGGGCTATA CGGCTTCTTTGTTGGTGATCCGCAAGA TCGCGGTACCATGAATTTTTAACGGT GCAAATGATGACAGTACTGCCAACCT CATCGTCTTGAGTGCCCATCCGAAGAA GAACCAGGAAAAGATCAGAACGGGACG CTCGAGAATCTCTACGAGGAATATCTG CAGCTCCTGCGGACGGAGGATGATCTT GTTGAGCTGGACTCTTTTGCTGAGTCGT TGCTGATGTGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGAGATGTTTCAAGCCATGC AGGCCAAGCGCGT</p>	<p>>EucglMYB64</p> <p>HLVAVDPLSRDGETGMGRAPCCAQV GLHRGPWTPREDSLLVNYIQAHGEGH WRSLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNYL RPDIKRGNIPTDEEDLIIRLHSLGNRW SLIAGRPLPGRTDNEIKNYWNTHLSKRL LRNQDNHPHTRPPSTKRRKTTAKSTK ESTKKS KHNNKSPNRASAEATERPK VHLPKAIKRVTTFSFLPRNDSFDCNTAI SWSSSQGGLLDREVAHVARSDETAG LYGFFVGDQPDRGHHEFFNGANDDS TANPHRLECPSEEEP GKDQNGTLENL YEEYLQLLRTEDDLVLQDSFAESLLM</p>
Eucgl.MYB68	<p>> Eucgl.MYB68</p> <p>AGAGAGAGAGAGAGAGAGAAGCCA AAAGCATGGGAAGAGCACCATGCTGTT CTAAGGTGGGTTTACGTAGAGGGCCTT GGACGAACAAAGAAGACACGGTGCTTG TCAAGTACATTCAAACGCATGGAGAAG GTCATTGGCGATCCTTGCTAAAAAAG CAGGGTTGCTGAGATGTGGGAAAAGCT GCAGGCTGAGTGGATGAACTATCTGA GGCCAGACATAAAGAGAGGGAACATCA CTCCGGATGAGGAAGACCTCATCATGA GGCTTCATGCCCTCCTCGGAAACCGGT GGTCGCTGATCGCTGGGCGACTGCCG GGCCGAACCGACAATGAAATCAAGAAC TACTGGAACCTGCACCTCAGCAAGAGG</p>	<p>>EucglMYB68</p> <p>EREREREAKSMGRAPCCSKVGLRRG PWTNKEDTVLVKYIQTHGEGHWRSPL KKAGLLRCGKSCRLRWMNYLRPDIKR GNITPDEEDLIMIRLHALLGNRWSLIAG RLPGRTDNEIKNYWNSHLSKR VATDS NENHSGLRGPKKRSNNNLIANKKK RRSEKSPQEDREEEVEVATTKKIKVH QPKAIRVSHIFSIARNNSFATVEVADEE VMAHDKRESNDMIINSNNDLSWMMS EAKEHNWFCDDDEDYNDMVDVEGCG GGGGGGGGGGCGDEMICS</p>

	<p> GTCGCTACCGACAGTAATGAAAACAC AGCAAGGGACTGAGAGGCCCAAAGAA GAGAAGCAACAACAACCTCATCGCCGC CAACAAGAAGAAGAGGCGGTCAGAGAA GAGCCCTCAGGAAGATCGAGAAGAAGA AGAAGAAGTCGCCACCACAAAGAAGAT AAAAGTCCACCAACCCAAGGCAATTAG GGTTTCACACATATTCTCCATCGCAAGG AACAAACAGCTTCGAGACTGTGGAGGTC GCTGACGAAGAAGTGATGGCGCATGAT AAGCGCGAGAGCAATGATATGATCATC AACAGTAACAATGATCTTTCGTGGATGA TGAGTGAGGCTAAAGAACAACACTGGT TCTGCGATGATGAAGATTACAATGACAT GGTGGATGTCGAAGGGTGC GGCGGCG GCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG TGGCTGTGGCGATGAGATGATCTGCTC G </p>	
<p>EnitxEglob.MYB64</p>	<p> >EnitxEglob.MYB64 TGAGATCGAATAGAAATTGAAACGCGCT AGTTCATTTTGTGTAGTGGAACTACTT GGATAACTTGTGTAAGGATGTTCCG ACTTCATACCGAGGGTGTGTTTGTATAC ACTAGTCAACGAGTATGCCATTGCCCTT GAGAAAGTACATCATAGGATTTGGAGA AAAGTTGAATAGGCATCATATACATTTA ACAAAACCCTAGAAAGTACAGGGGGGA TGAAAAATCTACAAGAGGTGGCCGTTT TCATAGTTTGAGAACTTACAAAGGCATC CGAGGTCCCGAGTTTGGCCAGAAGGT AAGCACGTGTTTTGTGGATCTACGATTC AAAACCACAGTGTAACCTAAACGCCCC ATTTGATTTTACGCGCTTGGCCTGCAT GGCTTGAAACATCTCTCTCTCTCTCTCT CACATCAGCAACGACTCAGCAAAAGAG TCCAGCTGAACAAGATCATCCTCCGTC CGCAGGAGCTGCAGATATTCCTCGTAG AGATTCTCGAGCGTCCCGTTCTGATCTT TTGCTGGTTCTTCTCGGATGGGCACT CAAGACGATGAGGGTTGGCAGTACTGT CATCATTGACCCGTTAAAAAATTCATG GTGACCGCGATCTTTCGGATCACCAAC AAAGAAGCCGTATAGCCCAGCAGTTTC ATCTGACCTGGCAACATGAGCCACTTC CCTGCCAAGTAACCCTCCTTGACTGGA GGACCAGCTAATCGCAGTGTGCAATC GAACTGTGCTTTCTAGGTAAGAGAA GGACGTAGTAACCCTAATGGCCTTGGG AAGATGAACTTTGGGCCTCTCCGTGGC CTCCGCGGATGCTCTATTAGGGCTCTT CTTGTTGTTGTGCTTCGATTTTTTGGTG CTCTCTTAGTGGATTTGGCGGTCGTTT TCCTCCTCTTAGTGGAGGGTGGACGAT GGGTCGGGTGATTGTCTTGATTTCTCA GGAGCCTTTTGTGAGGTGGGTGTTCC AGTAATTCTTGCTCTCGTTATCGGTTCC ACTGAGGAGCCTACTGGCAATGAGACA CCAGCGGTTGCCAAGAAGGGAGTGCA ATCTGATTTGACATGACAGCTCCCCTTG AATCTGTTCCATTCGGCTTCTCGGTCTT TGTTAGAGATTTGTACCTAGTGGATTG GCTTGCCTGATGAAAAAAGAGATGGAA </p>	<p> >EnitxEglob.MYB64 QRPRSRMEIQGELSCQIRLHSLLG RWCLIASRLLSRTDNESKNYWNTHLS KRLLRNQDNHPTHPPSTKRRKTTAK STKESTKKS KHNNKSPNRASAEATE RPKVHLPKAIRVTTSFSLPRNDSFDCN TAISWSSSQGGLLGREVAHVARSDET AGLYGFFVGDQPDRGHHEFFNGAND DSTANPHRLECPSEEEPAKDQNGTLE NLYEYQLLRTEDDLVQLDSFAESLL M </p>

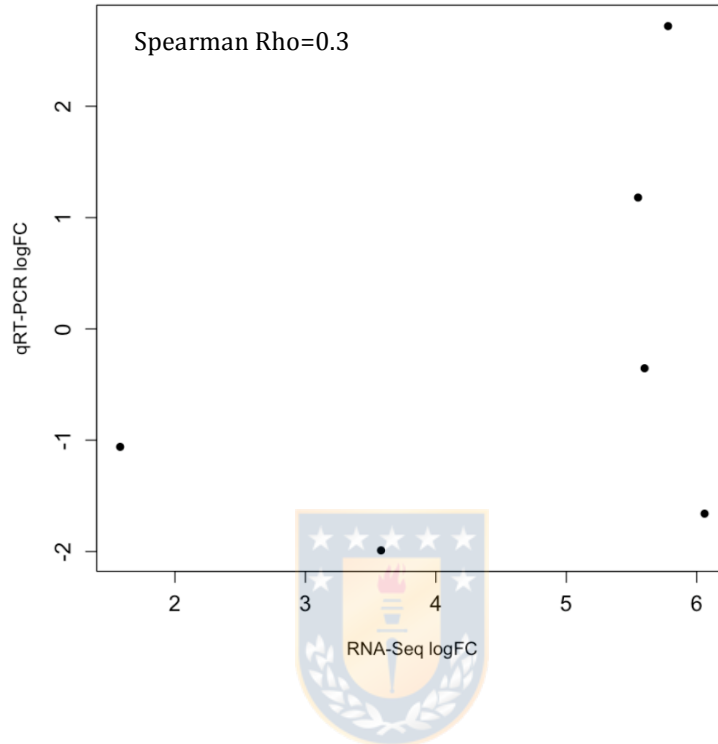
	CCAGAAATTGTGAA	
EnitxEglob.MYB68	>EnitxEglob.MYB68 ATCTGCCGGGCCGAACCGACAATGAAA TCAAGAACTACTGGAACCTGCACCTCA GCAAGAGGGTCGCTACCGACAGCAATG AAAACCACAGCAAGGGACTGAGAGGCC CAAAGAAGAGAAGCAACAACAACCTCA TCGCCGCCAACAAGAAGAAGAGGCGG TCAGAGAAGAGCCCTCAGGAAGATCGA GAAGAAGAAGAAGAAGTCGCCACCACA AAGAAGATAAAAGTCCACCAACCCAAG GCAATTAGGGTTTTCACACATATTCTCCA TCGCAAGGAACAACAGCTTCGAGACTG TGGAGGTCGCTGACGAAGAAGTGATGG CGCATGATAAGCGCGAGAGCAATGATA TGATCATCAACAGTAACAATGATCTTTC GTGGATGATGAGTGAGGCTAAAGAACA CAACTGGTTCTGCGATGATGAAGAT	>EnitxEglob.MYB68 LPGRTDNEIKNYWNSHLSKRVATDSN ENHSKGLRGPKKRSNNNLIAANKKKR RSEKSPQEDREEEEEVATTKKIKVHQ PKAIRVSHIFSIARNNSFETVEVADEEV MAHDKRESNDMIINSNNDLSWMMSE AKEHNWFCDEDED



Anexo 3. Predicción del dominio, estructura secundaria y modelo de los factores de transcripción MYB-R2R3



Anexo 4. Correlación de los valores de FC, estimados por qRT-PCR y por analisis *in silico*.



Anexo 5. Comparaciones de los valores de FC estimados por qRT-PCR y en la expresión *in-silico* por edgeR en los tratamientos de aclimatación en frío.

Target gene	<i>NA vs AAH</i>		<i>NA vs ADH</i>		<i>AAH vs ADH</i>	
	<i>In-silico</i>	qRT-PCR	<i>In-silico</i>	qRT-PCR	<i>In-silico</i>	qRT-PCR
<i>MYB64</i>	-1.99*	3.58	-1.66*	6,06*	2.72*	5,78*
<i>MYB68</i>	-1,06	1,58	-0.54	5,6*	1.18*	5,55*

*($P < 0.05$)