



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN EN RESPUESTA A ACLIMATACIÓN POR
BAJA TEMPERATURA DE UN GENOTIPO HÍBRIDO DE
*Eucalyptus nitens x Eucalyptus globulus***

Por

JORGE HOMERO HERNÁN CID COFRÉ

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

Profesora guía: Marta Fernández Reyes

Diciembre-2021
CONCEPCIÓN – CHILE

© 2021

JORGE HOMERO HERNN CID COFRÉ

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

**PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN
RESPUESTA A ACLIMATACIÓN POR BAJA TEMPERATURA DE UN GENOTIPO
HÍBRIDOS DE *Eucalyptus nitens* x *Eucalyptus globulus***

Profesor Patrocinante



Marta Fernández Reyes

Profesora Asociada

Bióloga; Dra. en Ciencias Forestales

Profesor Patrocinante



Estefanía Tarifeño-Saldivia

Profesora Asistente

Título; Ph .D

Calificación del Proyecto de Título:

Nombre Profesor:

Nombre Profesor:

DEDICATORIA

A mi madre María,

Mi hermano Alejandro,

Mi padre y tío que aún los siento a mi lado, Jorge Homero Cid Cea y Haroldo Cofre,

A mi pareja Antonieta Miranda.

A mis tíos Luis, Brígida, Raquel, Jorge, Verónica, Erica,

Mis padrinos Sergio y Audilia,

A mi fiel compañera gatuna Cuca,

A los que me apoyan, acompañan, y creen en mí.

AGRADECIMIENTOS

Deseo poder expresar mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos que me apoyaron de una u otra manera para poder concluir mi etapa como estudiante universitario, y que me guían para dar los primeros pasos como profesional.

En primer lugar, a mi profesora guía, Dra. Marta Fernández, quien brindo apoyo, confianza, y exigencias en el ámbito científico, dándome consejos de cómo llevar a cabo mi investigación, planteándome ideas y críticas siempre constructivas, y también dándome a entender que soy capaz de realizar aún más de lo que creo poder hacer.

A mi profesora co-guía, PhD Estefanía Tarifeño, por darme la confianza que necesitaba para llevar a cabo mis experimentos y análisis, como también sus sabios consejos que fueron de gran ayuda para dar termino a mi ciclo de pregrado.

Quiero también agradecer a mis familiares que brindaron palabras de motivación, a pesar de las adversidades, a mi madre que habla de mi con orgullo cuando comenta mi decisión de ser un profesional del área investigativa. A mi hermano, a quien admiro, y quien nunca dejo de creer en mí, ni en mis capacidades. A mis tíos, que, a pesar de confundir muchas veces mi carrera, saben tiene relación con el área vegetal, e investigación de esta misma.

A mi pareja, Antonieta Miranda, que ilumino mi camino con sus sabios consejos, compañía incondicional, y palabras de aliento a terminar mi carrera universitaria, agradezco cada uno de los momentos en los cuales me insto a seguir.

Y, por último, mis primos Luis y Héctor, y, amigos Nicolas, Fernando y Alejandra, quienes me apoyan, dan consejos, y dan fuerzas para continuar, ya sea en lo académico, laboral y sobre todo en lo personal.

Muchas gracias a cada uno y cada una.

TABLA DE CONTENIDO

I RESUMEN	1
II ABSTRACT	2
III INTRODUCCION	3
IV METODOLOGIA	7
4.1 Preparación material vegetal, extracción y secuenciación de ARN.....	7
4.2 Control de calidad, recorte y optimización de las lecturas.....	7
4.3 Identificación de factores de transcripción en híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i>	8
4.4 Búsqueda de dominios funcionales.	8
4.5 Anotación de factores de transcripción.	9
4.6 Alineamiento de las lecturas.....	9
4.7 Análisis de expresión génica diferencial.	9
4.8 Red de interacción.	10
4.9 Ontología genética.....	10
V RESULTADOS.....	11
5.1 Control de calidad y pre-procesamiento.....	11
5.2 Identificación y anotación de factores de transcripción.	18
5.3 Análisis de expresión génica diferencial.	21
5.4 Redes de interacción.....	34
5.5 Ontología genética.....	44

VI DISCUSION	49
VII CONCLUSIONES.....	53
VIII BIBLIOGRAFIA.....	54
IX APENDICE.....	59
Apéndice 1. Reglas para asignar la familia de factor de transcripción.	59
Apéndice 2 Proporción de base por posición en las secuencias antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 2 y 3 AAH.	63
Apéndice 3 Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 2 y 3 AAH.....	64
Apéndice 4 Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 2 y 3 AAH.....	65
Apéndice 5 Puntaje de calidad por secuencia antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 2 y 3 AAH.....	66
Apéndice 6 Proporción de base por posición en las secuencias antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 ADH.	67
Apéndice 7 Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 ADH...	68
Apéndice 8 Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 ADH.....	69
Apéndice 9 Puntaje de calidad por secuencia antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 ADH.....	70

Apéndice 10 Proporción de base por posición en las secuencias antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 NA.....	71
Apéndice 11 Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 NA.....	72
Apéndice 12 Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 NA.....	73
Apéndice 13 Puntaje de calidad por secuencia antes y después de procesar el extremo 5' de las muestras 1, 2 y 3 NA.....	74
Apéndice 14. Tabla comparativa entre número de Factores de transcripción representados en <i>E. nitens x E. globulus</i> , por especie.	75
Apéndice 15. Número total de factores de transcripción del híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> expresados por familia y condición.	76
Apéndice 16. Valores de expresión Log ₂ FoldChange obtenidos mediante el análisis por DESeq2 en las condiciones NA vs AAH.	78
Apéndice 17. Valores de expresión Log ₂ FoldChange obtenidos mediante el análisis por DESeq2 en las condiciones AAH vs ADH.	82
Apéndice 18. Valores de expresión Log ₂ FoldChange obtenidos mediante el análisis por DESeq2 en las condiciones NA vs ADH.	84
Apéndice 19. Interactoma entre NA y AAH de los factores de transcripción anotados en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i>	89
Apéndice 20. Interactoma entre AAH y ADH de los factores de transcripción anotados en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i>	90

Apéndice 21. Interactoma entre NA y ADH de los factores de transcripción anotados en el híbrido <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i>	91
--	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de bibliotecas generadas, número de lecturas y largo de ellas antes y después del pre-procesamiento.	17
Tabla 2. Número y porcentaje de FT anotados, representados en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> , por especie.....	20
Tabla 3. Número total de genes y factores de transcripción del híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> expresados por condición.....	21
Tabla 4. Número total de genes y factores de transcripción del híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> expresados de manera diferencial por condiciones pareadas.....	22
Tabla 5. Interacción de factores de transcripción que presentaron mayor número de genes objetivos en redes predichas con la base de datos <i>A. thaliana</i>	36

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Proporción de base por posición en las secuencias antes de procesar.....	11
Figura 2. Proporción de base por posición en las secuencias de la muestra después del recorte de nucleótidos del extremo 5'	12
Figura 3. Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes de procesar.	13
Figura 4. Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca después del recorte de nucleótidos del extremo 5'.....	13
Figura 5. Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes de procesar.	14
Figura 6. Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'	15
Figura 7. Puntaje de calidad por secuencia antes de procesar.....	16
Figura 8. Puntaje de calidad por secuencia después del recorte de nucleótidos del extremo 5'	16
Figura 9. Porcentaje de cada Familia de factores de transcripción con hit positivo en el transcriptoma <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i>	19
Figura 10. Porcentaje de cada familia de factores de transcripción anotados en el transcriptoma <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i>	19

Figura 11. (A) MA de expresión diferencial entre condiciones NA y AAH. (B) Análisis de componentes principales de los datos normalizados de cada replica. NA vs AAH....	23
Figura 12. (A) MA de expresión diferencial entre condiciones NA y ADH. (B) Análisis de componentes principales de los datos normalizados de cada replica. NA y ADH..	24
Figura 13. (A) MA de expresión diferencial entre condiciones AAH y ADH. (B) Análisis de componentes principales de los datos normalizados de cada replica. AAH y ADH...	25
Figura 14. Factores de transcripción diferencialmente expresados en la combinación de tratamientos NA vs AAH	26
Figura 15. Factores de transcripción diferencialmente expresados en la combinación de tratamientos AAH vs ADH	28
Figura 16. Factores de transcripción diferencialmente expresados en la combinación de tratamientos NA vs ADH	30
Figura 17. Mapa de calor de factores de transcripción diferencialmente expresados.....	32
Figura 18. Mapa de calor de factores de transcripción diferencialmente expresados en NA vs AAH, AAH vs ADH, y, NA vs ADH.....	34
Figura 19. Interactoma entre NA y AAH del factor de transcripción anotado en el híbrido <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> EnigloNAC 42	37
Figura 20. Interactoma entre NA y AAH del factor de transcripción anotado en el híbrido <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> EnigloE2F/DP 1.....	38

Figura 21. Interactoma entre AAH y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> EnigloNAC 37	39
Figura 22. Interactoma entre NA y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> EnigloNAC 6	41
Figura 23. Interactoma entre NA y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> EnigloE2F/DP 1.....	42
Figura 24. Interactoma entre NA y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido <i>E. nitens x E. globulus</i> EnigloARF 3.....	43
Figura 25. Enriquecimiento por ontología genética sobrerrepresentados de procesos biológicos, en las interccion NA vs AAH. A) Factores de transcripción regulados positivamente, B) Factores de transcripción regulados negativamente.	45
Figura 26: Enriquecimiento por ontología genética sobrerrepresentados de procesos biológicos, en las interacción AAH vs ADH. A) Factores de transcripción regulados positivamente, B) Factores de transcripción regulados negativamente.	46
Figura 27: Enriquecimiento por ontología genética (GO) sobrerrepresentados de procesos biológicos, en las interccion NA vs ADH. A) Factores de transcripción regulados positivamente, B) Factores de transcripción regulados negativamente.....	48

I RESUMEN

El cultivo del género *Eucalyptus* esta principalmente predominado por *E. globulus* y *E. nitens* donde *E. globulus* posee importancia económica, gracias al crecimiento que este posee y a la calidad de su madera, por otro lado, *E. nitens* posee mayor crecimiento, como también por ser resistente a heladas y tolerante a fríos extremos. Uno de los programas de mejoramiento importante, es la hibridación entre *E. nitens* y *E. globulus*, que busca las características de enraizamiento y propiedades de la madera de *E. globulus* y la alta tasa de crecimiento junto con la tolerancia al frío de *E. nitens*. En este estudio de análisis *in silico* se caracterizó el perfil transcriptómico de 855 factores de transcripción de 53 familias diferentes del híbrido *E. nitens x E. globulus* en respuesta a la aclimatación por bajas temperaturas y temperaturas de congelamiento, a su vez se obtuvo que las familias con mayor regulación negativa entre las combinaciones de tratamientos fueron bHLH, WRKY, y, MYB_related, por otro lado, se obtuvo que las familias bHLH, WRKY, NAC, MYB presentaron mayor regulación positiva. De todos los factores de transcripción expresados diferencialmente EnigloWRKY 5, EnigloMYB_related 31, EnigloMYB 39, EnigloGRAS 30, EnigloGRAS 30, EnigloNAC 13, arrojaron un aumento en su expresión. También se obtuvo que EnigloNAC 42, EnigloNAC 37, EnigloNAC 6, EnigloE2F/DP 1, y, EnigloARF 3 se encontraron relacionados en diversos procesos biológicos dentro del transcriptoma, siendo candidatos para futuros estudios.

II ABSTRACT

The cultivation of the genus *Eucalyptus* is mainly dominated by *E. globulus* and *E. nitens*, where *E. globulus* has economic importance, thanks to the quality of its wood, *E. nitens* has higher growth rate, as well tolerance to frost. One of the important breeding programs is the hybridization between *E. nitens* and *E. globulus*, looking for rooting features and wood properties of *E. globulus*, and the high growth rate together with the cold tolerance of *E. nitens*. In this *in silico* study, characterization of the transcriptomic profile of hybrids under cold acclimation treatments were performed. In this analysis 855 transcription factors from 53 different families off the hybrid *E. nitens* x *E. globulus*, in response to cold acclimation and frost temperatures, obtained. Among them, turn it was obtained that the families with most negative regulation were bHLH, WRKY, and MYB_related, in other hand, the families with most positive regulation were bHLH, WRKY, NAC, and MYB. Between all transcription factors differentially expressed EnigloWRKY 5, EnigloMYB_related 31, EnigloMYB 39, EnigloGRAS 30, EnigloGRAS 30, and EnigloNAC 13 exhibited an increase in their expression. Also, it was obtained that EnigloNAC 42, EnigloNAC 37, EnigloNAC 6, EnigloE2F/DP 1, y, EnigloARF 3 were found related in various biological processes within the transcriptome, being candidates for future studies.

III INTRODUCCION

La industria forestal ha ido evolucionando de manera lenta, pero constante, y de manera creciente donde hace aproximadamente 60 años la silvicultura de producción basada en especies exóticas comenzó en el hemisferio sur (Grattapaglia 2008). La superficie total a nivel mundial de plantaciones forestales es de 279 millones de hectáreas, donde Chile ocupa el puesto número 18, lo que corresponde al 1,1% de la superficie al año 2015. (INFOR, 2018). La superficie del territorio continental chileno es de 75,6 millones de hectáreas, de la cual 2.4 millones corresponden a plantaciones forestales equivalente al 3,2% de la superficie del país, donde las principales especies cultivadas son *Pinus radiata* D. Don (57,6%), *Eucalyptus globulus* Labill (24,5%), *Eucalyptus nitens* Deane and Maiden (11,1%) (INFOR 2018b). Chile se encuentra entre los países de mayor producción de pulpa para papel en el mundo, alcanzando un 7% del consumo internacional, siendo el segundo país sudamericano con mayores exportaciones después de Brasil (FAOSTAT 2019).

El género *Eucalyptus* originario de Australia, y perteneciente a la familia de las *Myrtaceae*, presenta una gran diversidad, superando las 600 especies descritas, a su vez es de importancia internacional, debido a la posibilidad de producir madera en corto tiempo en rotaciones, cortas suministrando materia prima de alta calidad para madera, papel, pulpa y energía. (Barrios *et al* 2004, Granados-Sánchez & López-Ríos 2007, Grattapaglia 2008). La llegada a Chile del género *Eucalyptus* fue en el primer trimestre del siglo XIX (Grattapaglia 2008). Hacia el año 2016 el cultivo del género *Eucalyptus* está principalmente predominada por *E. globulus* y *E. nitens* con una superficie de 24,5% y 11,1% respectivamente, siendo la región del Biobío la de mayor superficie cultivada alcanzando 928.356 hectáreas (INFOR, 2018). Las ventajas que cada especie presenta, se debe a que *E. globulus* posee importancia económica, debido al gran rendimiento en pulpa, y mayor densidad básica en su madera, por otro lado, *E. nitens* posee menores rendimientos palpables volumétricos, pero que se pueden suplir con un mayor crecimiento, como también por ser resistente a heladas y

tolerante a fríos extremos, donde *E. globulus* no logra establecerse en los primeros años. (Gutiérrez 2006, Guzmán & Yanitza 2006, Acevedo Meins 2008).

En el año 1988 algunas empresas forestales comienzan a establecer plantaciones de *E. globulus* y *E. nitens*, a su vez el INFOR comienza a discutir un programa de mejoramiento genético para el género, pero no es hasta el año 1990 que las empresas forestales comienzan con los programas de mejoramiento, seguidos por INFOR en el año 1991. No es hasta el año 2001 donde se decidió buscar individuo de *E. globulus* tolerantes al estrés por frío, y ya en el año 2004 comienza un programa de hibridación entre especies del género *Eucalyptus*, para poder conferir tolerancia a sequía a *E. globulus*. (Ipinza *et al* 2014). Uno de los programas de mejoramiento importante, es la hibridación entre *E. nitens* y *E. globulus*, el cual se encuentra simplificado en la figura 1, donde se busca las características de enraizamiento y dar énfasis en las propiedades de la madera de *E. globulus* y la alta tasa de crecimiento junto con la tolerancia al frío de *E. nitens*. (Ipinza *et al* 2014)

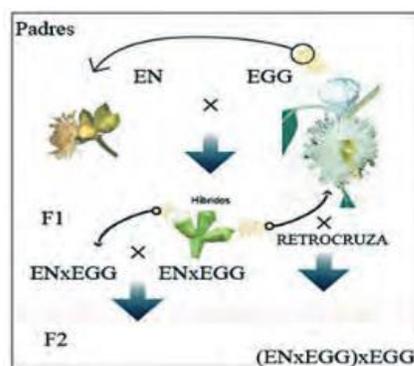


Fig 1. EN: *Eucalyptus nitens*; EGG: *Eucalyptus globulus* (modificado de Ipinza *et al*, 2014)

El estrés por frío, se separa en temperaturas de enfriamiento (inferiores a los 15°C), provocando en las plantas alteraciones fisiológicas, disminuyendo su crecimiento, menor expansión foliar, marchitamiento, clorosis e inclusive necrosis en sus tejidos, por otro lado las temperaturas de congelamiento (inferiores a los 0°C), los daños pueden llegar a ser muy severo, ocasionando deterioros en la membrana, estrés hídrico e incluso muerte en

los tejidos de la planta (Morales *et al* 2003, Navarrete 2017). A pesar de que el género *Eucalyptus* se distribuye ampliamente a nivel mundial, su cultivo se ve limitado a la sensibilidad a congelación que estos presentan, es por esto que las investigaciones en *Eucalyptus* se centran principalmente en las bajas temperaturas, y como están asociados algunos genes a la tolerancia al frío, también en comprender la regulación de genes, y también en describir perfiles transcripcionales en respuesta a bajas temperaturas, para poder entender de mejor manera como una combinación de cambios fisiológicos y metabólicos que dependen de las modificaciones del transcriptoma, generan la respuesta adaptativa a aclimatación por frío (El Kayal *et al* 2006, Gaete-Loyola *et al* 2017).

La respuesta genética se puede clasificar en dos principalmente, genes funcionales y genes reguladores, donde los primeros son los que corresponden a regiones que codifican a proteínas, como por ejemplo las proteínas de choque térmico o *heat shock proteins* (HSP) que, durante la aclimatación al frío estas se unen como chaperonas a ciertas proteínas para evitar la desnaturalización por el congelamiento. Por otra parte, los genes reguladores son los denominados factores de transcripción (elementos *trans*), los cuales regulan el nivel de expresión o abundancia de transcritos o ARNm (Navarrete 2017). En *E. globulus* se estudió la familia WRKY, donde se demostró que múltiples factores de transcripción eglWRKY están regulados a temperatura de enfriamiento (4°C), y congelación (-6°C), de los cuales 11 genes mostraron estar regulados bajo la aclimatación por frío derivados de ensayos de qRT-PCR en tejido foliar (Aguayo *et al* 2019). Por otro lado, en *E. nitens* los factores de transcripción de las familias AP2, MYB, y WRKY fueron los representados mayoritariamente como genes diferencialmente expresados bajo aclimatación por frío (Aguayo *et al* 2019). Factores de transcripción de la familia bHLH han sido reportados en perfiles transcripcionales de *E. globulus*, como en *E. nitens*, bajo aclimatación por frío y déficit hídrico (Aguayo *et al.* 2019, Fernández *et al.* 2015, Gaete-Loyola *et al.* 2017).

Por estas razones se trata de responder a la siguiente pregunta, ¿Existe diferencia en la expresión de transcritos relacionados a familias de factores de transcripción bajo condiciones de aclimatación por frío y aclimatación por temperaturas de congelamiento?,

con lo cual se responde que, las Familias de factores transcripcionales bHLH, WRKY, MyB y AP2 son las que presentan el mayor número de genes diferencialmente expresados en un perfil transcripcional del híbrido *E. nitens x E. globulus* aclimatado a baja temperatura.

El objetivo general del presente trabajo es caracterizar el perfil transcripcional del híbrido *E. nitens x E. globulus* en respuesta a aclimatación a baja temperatura para identificar las familias de factores de transcripción con el mayor número de genes diferencialmente expresados y generar una red de interacción de proteínas para identificar sus genes objetivos putativos, y como objetivos asociar las secuencias del híbrido *E. nitens x E. globulus* a alguna familia de factor de transcripción, determinar los factores de transcripción expresados diferencialmente en el híbrido *E. nitens x E. globulus* bajo condición control y aclimatación a bajas temperaturas, y, generar una red de interacción para identificar los genes objetivos putativos de los factores transcripcionales identificados en el híbrido *E. nitens x E. globulus*.

IV METODOLOGIA

4.1 Preparación material vegetal, extracción y secuenciación de ARN.

Para realizar los análisis *in silico* se contó con los datos obtenidos a partir del proyecto Fondecyt 11121559, en el cual el material vegetal fue sometido por parte del laboratorio de genómica forestal, a dos tratamientos en cámara fría: frío a bajas temperaturas (AAH), frío aclimatado a las temperaturas de congelamiento (ADH), y, a condición control (NA).

Los tratamientos contaron con 3 réplicas biológicas por condición, donde de cada una se extrajo ARN de 9 hojas con el protocolo CTAB RNA. La integridad, la calidad y la cantidad se evaluaron usando Agilent 2100 BioAnalyzer y Eukaryote Total RNA Nano Assay.

Finalmente se prepararon nueve bibliotecas de secuencias utilizando el kit de ARNm truSeq (Illumina).

Con estas 9 bibliotecas de expresión secuenciadas se realizaron los análisis de este trabajo de título.

4.2 Control de calidad, recorte y optimización de las lecturas.

Se utilizó el programa *FastQC* para determinar la calidad de los reads obtenidos de la secuenciación de las 9 bibliotecas generadas. Y con el programa *Cutadapt* se eliminaron adaptadores, sesgo en la distribución de nucleótidos, y secuencias contaminantes. Después del proceso de corte se seleccionaron secuencias procesadas con tamaño igual o superior a 50 pb.

4.3 Identificación de factores de transcripción en híbrido *E. nitens* x *E. globulus*.

Se empleó como transcriptoma de referencia el ensamble realizado previamente del híbrido de *E. nitens* x *E. globulus*. La identificación de factores de transcripción en el ensamble del híbrido *E. nitens* x *E. globulus* se llevó a cabo utilizando *BLASTX* (e-value 1×10^{10} , identidad 45%, largo de secuencia alineada 100aa) y *BLASTN* (e-value 1×10^{10} , identidad 90%, largo de secuencia alineada 300ncl) con las siguientes bases de datos realizadas previamente 1) Secuencias de aminoácidos de proteínas anotadas del genoma de *Eucalyptus grandis*, V2.0 de la base de datos Phytozome 12; 2) Secuencias de nucleótidos de transcritos anotados del genoma de *E. grandis* V2.0 de Phytozome 12; 3) colección completa de factores de transcripción de la base de datos de plantas (PTFDB) de la página “<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>”. Cada hit positivo para factores de transcripción se seleccionó para análisis posteriores.

4.4 Búsqueda de dominios funcionales.

Se usó como transcriptoma de referencia el ensamble realizado previamente del híbrido de *E. nitens* x *E. globulus*, el cual fue procesado con *Repeat mask*, para enmascarar secuencias repetidas y posterior traducción a secuencias de aminoácidas el transcriptoma de referencia con *Transeq*.

Se descargó el perfil HMM de Pfam v32.0, y los dominios funcionales que no se encuentran en la base de datos Pfam y son necesarios para la caracterización de factores de transcripción. Fueron descargados desde PLANTTFDB como archivos de alineamiento creados con CLUSTAL 2.1, donde se creó un nuevo perfil HMM el cual se utilizó para caracterizar los dominios funcionales restante denominados “self-build”.

Finalmente se usó *HMMscan* con e-value 1×10^{-10} utilizando el perfil HMM de la base de datos Pfam v32.0 y el perfil “self-build”

4.5 Anotación de factores de transcripción.

Se utilizaron tres reglas para asignar una función a todos los hits positivos del transcriptoma de referencia en el alineamiento que presente el o los dominios funcionales necesarios, donde se clasificaron de acuerdo a los dominios que presenten, separando en superfamilias los que presenten dominio de unión a ADN, luego dentro de las mismas se agruparon en familias de acuerdo al número de dominios de unión a ADN, el tipo, y el dominio auxiliar que requieran, también se excluyeron como factor de transcripción aquellos que presentaron un dominio no admitido como factor de transcripción.

Las reglas para cada una de las familias se pueden apreciar en el apéndice 1.

Todos los hits positivos del transcriptoma de referencia en el alineamiento que presentaron la misma secuencia blanco y misma familia de factor de transcripción, se agruparon tomados como un solo factor de transcripción.

Se asignó el nombre “Eniglo” a cada factor de transcripción seguido por la familia de factores transcripcionales.

4.6 Alineamiento de las lecturas.

Se empleó como transcriptoma de referencia el ensamblado realizado previamente del híbrido de *E. nitens* x *E. globulus*. Para realizar el alineamiento se utilizó el método de estimación por modelo RSEM el cual incluye el método de alineamiento Bowtie2. Las lecturas alineadas se obtuvieron en formato BAM.

4.7 Análisis de expresión génica diferencial.

Se realizará la matriz de abundancia mediante el método RSEM que se incluye en el paquete de TRINITY.

Se utilizará el programa Deseq2 para realizar la normalización de expresión y la prueba estadística de expresión diferencial. Se compararán No aclimatado vs Aclimatada antes

de helada; No aclimatada vs Aclimatada después de helada; Aclimatada antes de helada vs Aclimatada después de helada. Se tomarán como diferencialmente expresado los valores Log2 Fold change superior a 1 e inferior a -1, con padj 0.05

Se utilizo heatmpa.2 en R para la realización de mapas de calor con valores de padj 0.05

4.8 Red de interacción.

Se realizará una red de interacción proteína-proteína con el programa Cytoscape 3.7.2 utilizando los datos de interacción de *Arabidopsis thaliana* (Ecotipo Columbia) v.3.5.182 de la base de datos curada BioGRID. Se agregarán los datos de expresión diferencial de los factores de transcripción anotados, y los transcritos alineadas con las secuencias de proteínas y aminoácidos de *E. grandis* (BLASTX (e-value 1×10^{10} , identidad 45%, largo de secuencia alineada 100aa) y BLASTN (e-value 1×10^{10} , identidad 90%, largo de secuencia alineada 300ncl) que presenten mayor identidad con secuencias de *A. thaliana*.

4.9 Ontología genética.

Los factores de transcripción anotados de *E. nitens* x *E. globulus* diferencialmente expresados en cada interacción de condiciones (NA vs AAH, AAH vs ADH, y NA vs ADH) se le asignó una secuencia de *A. thaliana* con mayor identidad. Los genes anotados se analizaron con el complemento *BiNGO 3.0.3 Cytoscape 3.7.2* configurado con una prueba hipergeométrica y una tasa de falso descubrimiento de Benjamini y Hochberg de 0.05. Se redujo la redundancia de términos y agruparon los similares con el uso de la plataforma *REVIGO* con una lista de redundancia pequeña (0.5), asociados por p-value, utilizando la base de datos de *A. thaliana*, y con una medida de similitud SimRel. Finalmente el resultado arrojado por la plataforma *REVIGO*, se visualizó en Cytoscape 3.7.2 .

V RESULTADOS

5.1 Control de calidad y pre-procesamiento.

La librería de secuenciación para los tratamientos AAH, ADH y NA mostraron un contenido por base no homogéneo en los primeros 15 nucleótidos (Figura 1), el cual corresponde a adaptadores universales Illumina como se puede observar en la figura 3.

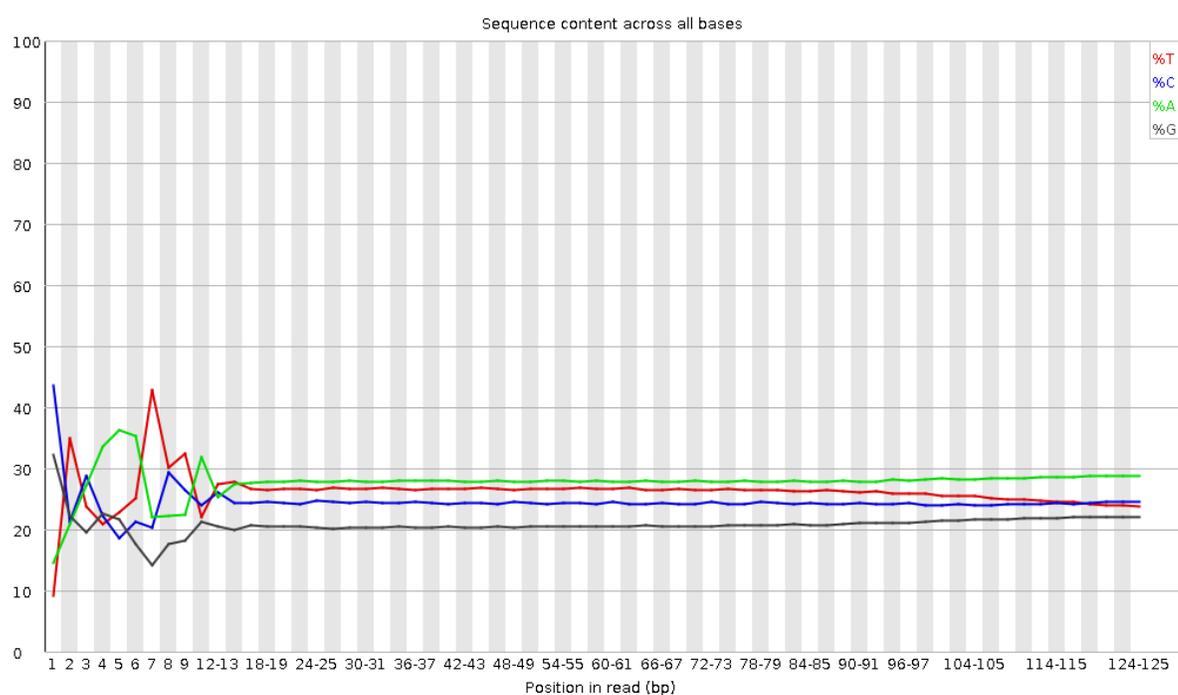


Figura 1. Proporción de base por posición en las secuencias antes de procesar de la muestra 1 del tratamiento AAH. Eje horizontal es la posición en la lectura, mientras que el eje vertical muestra el porcentaje. Guanina gris, citosina azul, timina rojo, adenina verde.

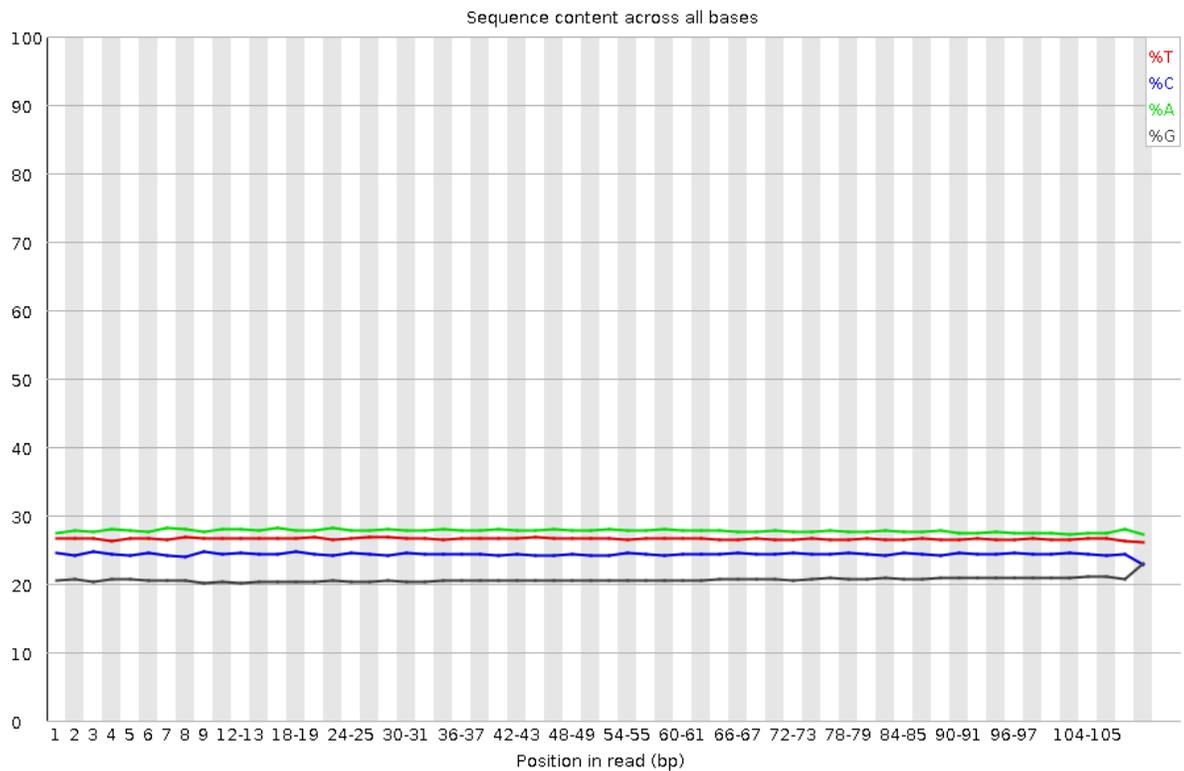


Figura 2. Proporción de base por posición en las secuencias de la muestra 1 del tratamiento AAH después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Eje horizontal es la posición en la lectura, mientras que el eje vertical muestra el porcentaje. Guanina gris, citosina azul, timina rojo, adenina verde.

Donde posteriormente utilizando la herramienta *CUTADAPT* se eliminaron los primeros 15 nucleótidos con el fin de remover cualquier sesgo de secuenciación de nuestros datos (Figura 2), y obtener secuencias libres de adaptadores (Figura 4).

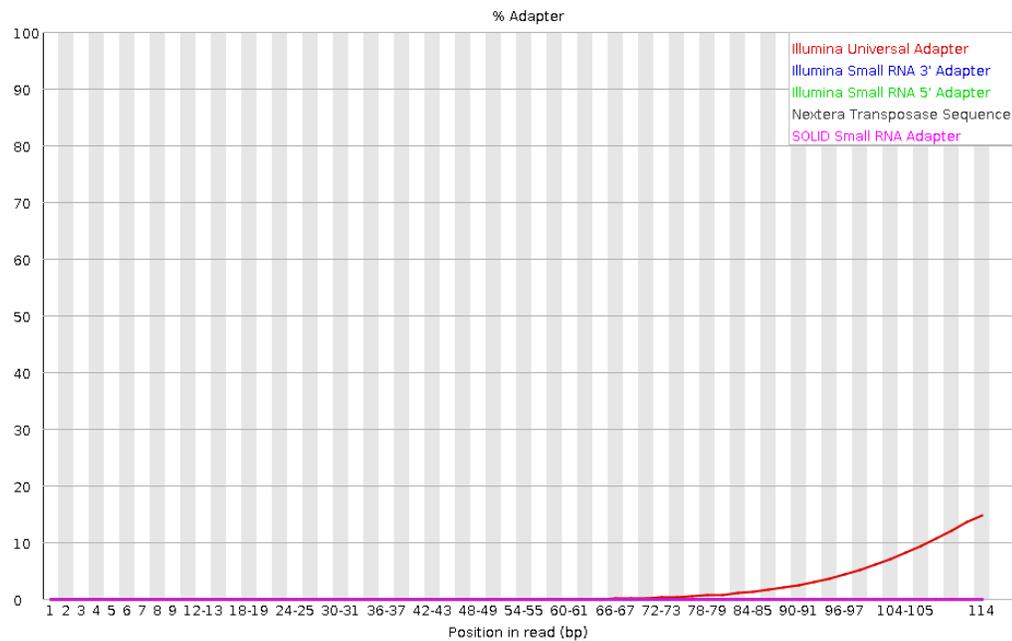


Figura 3. Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca de la muestra 1 del tratamiento AAH antes de procesar.

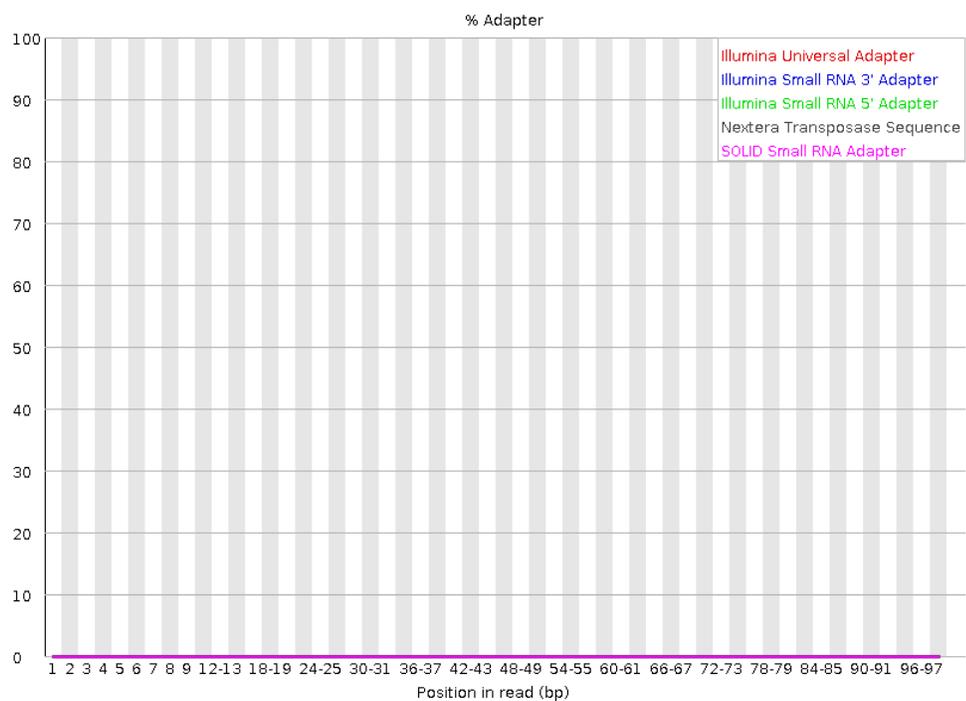


Figura 4. Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca de la muestra 1 del tratamiento AAH después del recorte de nucleótidos del extremo 5'.

El reporte de análisis por base de secuencia arrojó buena calidad a lo largo de cada una de las posiciones, como se puede observar en los parámetros de media, mediana y ubicación de los cuartiles en la figura 5, lo que se puede complementar con el reporte de calidad de cada secuencia, que indica que la precisión de secuenciaciones al menos un Phred de 37 (Figura 7), estos parámetros se mantuvieron posterior al preprocesamiento de las bibliotecas como muestran la figuras 6 y 8. Por esta razón no es necesario realizar un procesamiento de filtro de las lecturas restantes

El resultado para todas las librerías generadas es similar y son incluidos desde el apéndice 2 al 13.

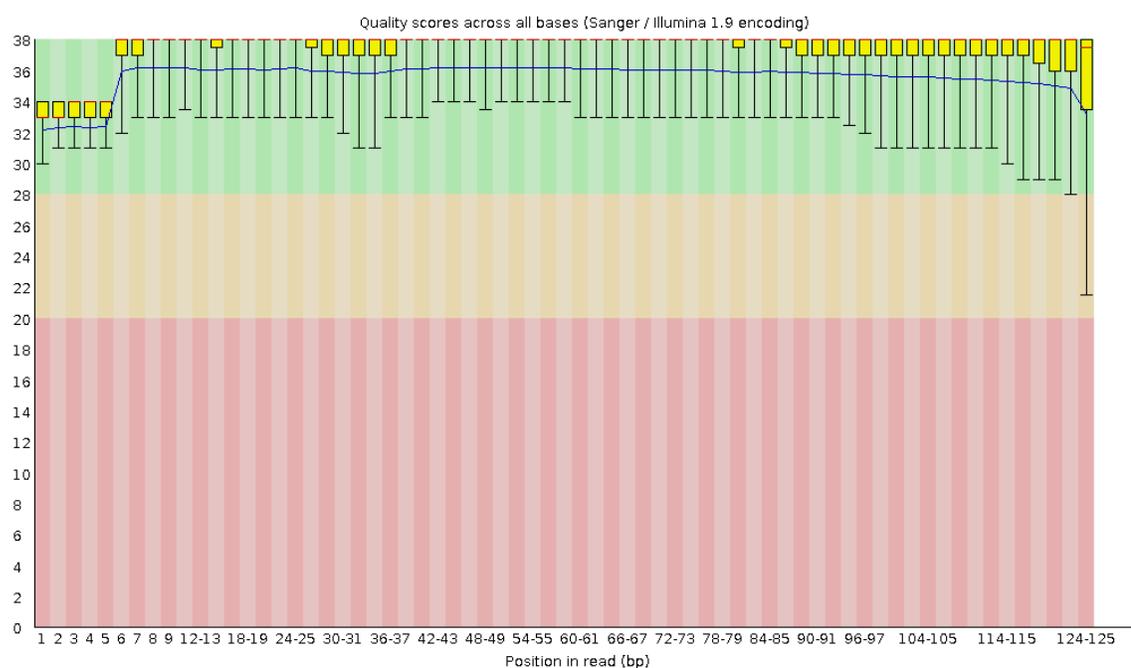


Figura 5. Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias de muestra 1 del tratamiento AAH antes de procesar. En amarillo los cuartiles; la línea roja es la media de calidad; línea azul la mediana. En el eje X, la cantidad de bases de las lecturas, El eje Y, se representan las calidades 0-38: Zona verde: 28-38. Corresponden a una muy buena calidad; Zona naranja: zona de calidad intermedia (20-28).

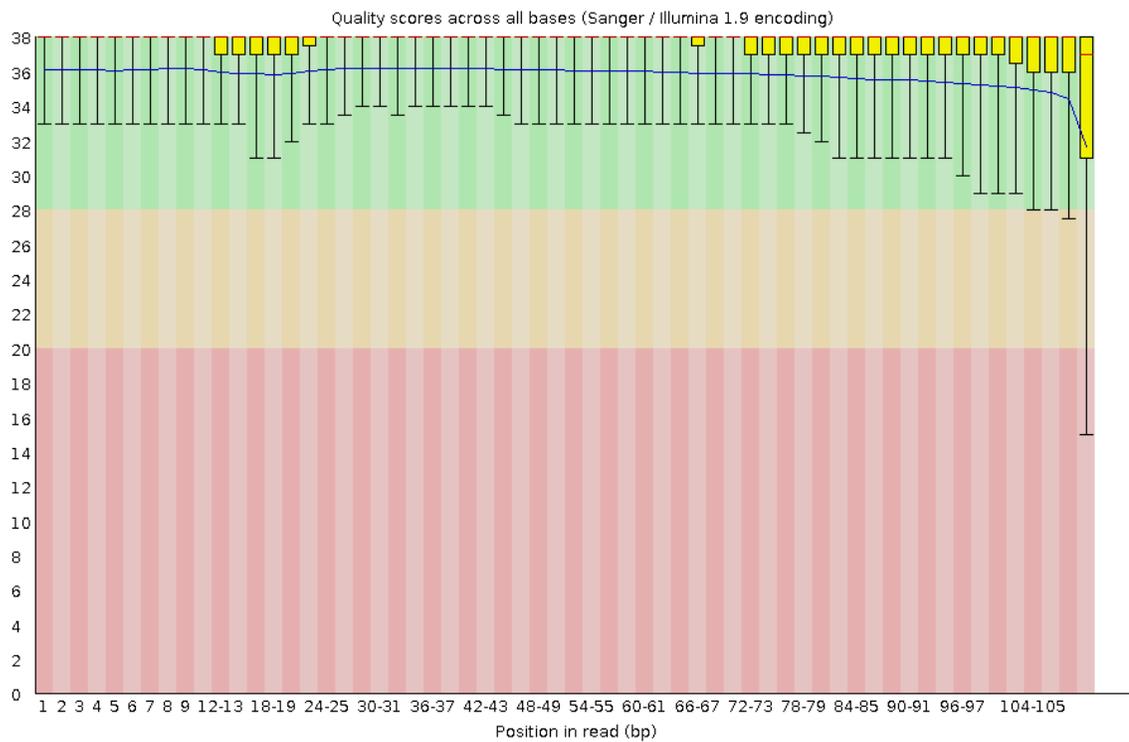


Figura 6. Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias de muestra 1 del tratamiento AAH después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En amarillo los cuartiles; la línea roja es la media de calidad; línea azul la mediana. En el eje X, la cantidad de bases de las lecturas, El eje Y, se representan las calidades 0-38: Zona verde: 28-38. Corresponden a una muy buena calidad; Zona naranja: zona de calidad intermedia (20-28).

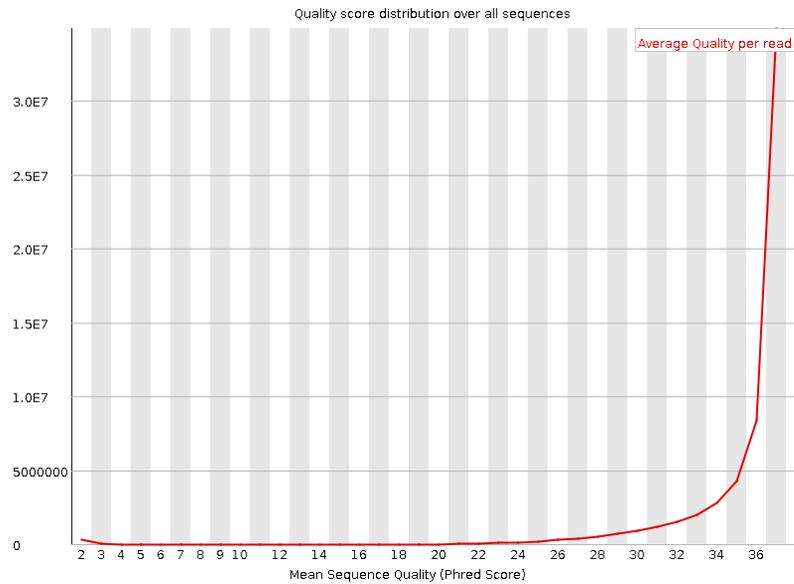


Figura 7. Puntaje de calidad por secuencia de la muestra 1 del tratamiento AAH antes de procesar. En el eje vertical se muestra el número de lecturas en la biblioteca. El eje horizontal la calidad promedio de la secuencia (Puntaje Phred).

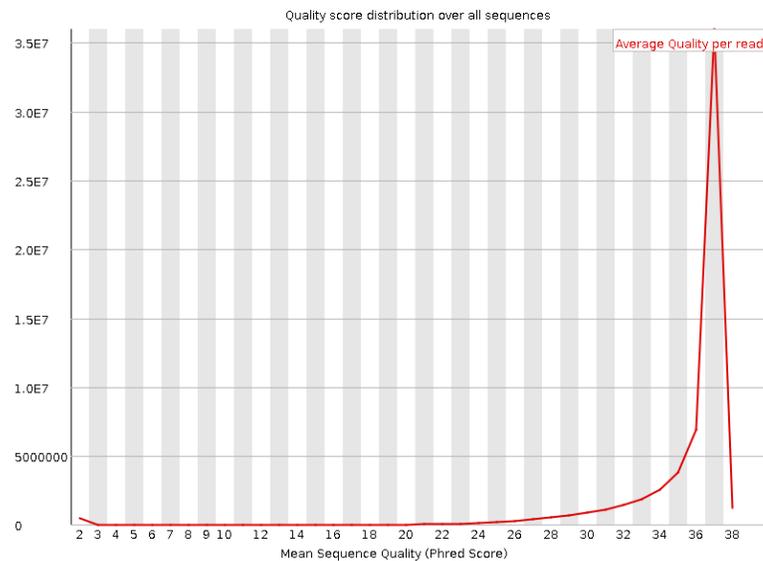


Figura 8. Puntaje de calidad por secuencia de la muestra 1 del tratamiento AAH después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En el eje vertical se muestra el número de lecturas en la biblioteca. El eje horizontal la calidad promedio de la secuencia (Puntaje Phred).

El preprocesamiento resulto en el descarte de máximo un 0,32% de las lecturas totales por librería, como se presenta en la tabla 1, permitiéndonos continuar nuestros análisis con set de datos compuesto por más de 30 millones de lecturas.

Tabla 1. Lista de bibliotecas generadas, número de lecturas y largo de ellas antes y después del pre-procesamiento.

Tratamiento	N.º total de lecturas	N.º total de lecturas después de recorte nucleótidos extremo 5'	% de lecturas descartadas después de recorte nucleótidos extremo 5'
AAH Rep 1	59.954.621	59.808.974	0,24
AAH Rep 2	61.266.247	61.167.385	0,16
AAH Rep 3	43.312.396	43.198.496	0,26
ADH Rep 1	53.834.732	53.738.605	0,18
ADH Rep 2	65.211.081	65.002.537	0,32
ADH Rep 3	35.016.494	34.969.599	0,13
NA Rep 1	56.670.748	56.536.352	0,24
NA Rep 2	58.560.134	58.443.903	0,20
NA Rep 3	37.933.176	37.859.929	0,19

5.2 Identificación y anotación de factores de transcripción.

Con el fin de asignar una función a cada uno de los hits positivos del transcriptoma de referencia de *E. nitens x E. globulus* con las secuencias génicas y proteicas de *E. grandis* y de la base de datos de PlantTFDB se realizó un filtro de todas las secuencias con hit positivo que presentaran los dominios funcionales correspondiente a las reglas de cada una de las familias de factores de transcripción. El número total de factores de transcripción con hits positivo para una de las 53 familias fue de 1191 (Apéndice N°14, *Columna N° de FT con hit positivo*), siendo bHLH la familia con mayor representación con (15%), seguido por WRKY (10%), NAC (8%), MYB (7%), MYB_related (6%), G2-LIKE (5%), GRASS (4%), ERF (4%), FAR1 (3%) y B3 (3%), el resto de las familias suman un total de 35% de hits positivos (Figura 9).

Por otra parte, los hits positivos que mostraron la misma secuencia génica o proteica de *E. grandis*, o la misma secuencia proteica de la base de datos de PlantTFDB en más de una secuencia del transcriptoma de referencia de *E. nitens x E. globulus* fueron asignadas como una sola secuencia anotada. El número total de factores de transcripción anotados como unigenes para una de las 53 familias fue de 855 (Apéndice N°14, *Columna N° de FT anotados*), siendo bHLH la familia con mayor representación con (13%), seguido por WRKY (9%), MYB_related (8%), MYB (8%), NAC (8%), GRASS (8%), ERF (4%), G2-LIKE (4%), B3 (3%), y FAR1 (3%), el resto de las familias de factores de transcripción anotadas suman un total de 35% (Figura 10).

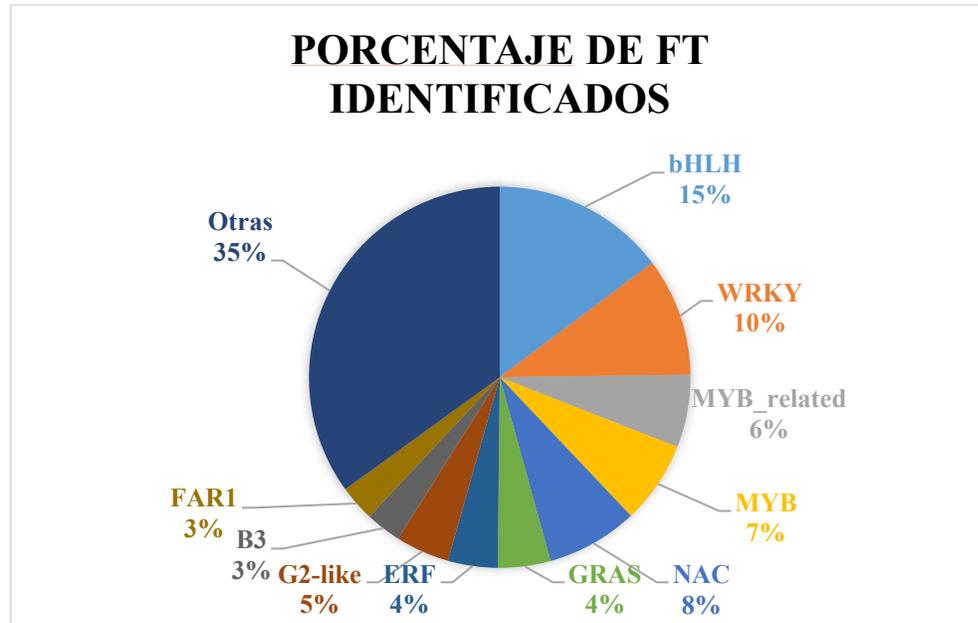


Figura 9. Porcentaje de cada Familia de factores de transcripción identificados en el transcriptoma *E. nitens x E. globulus*.

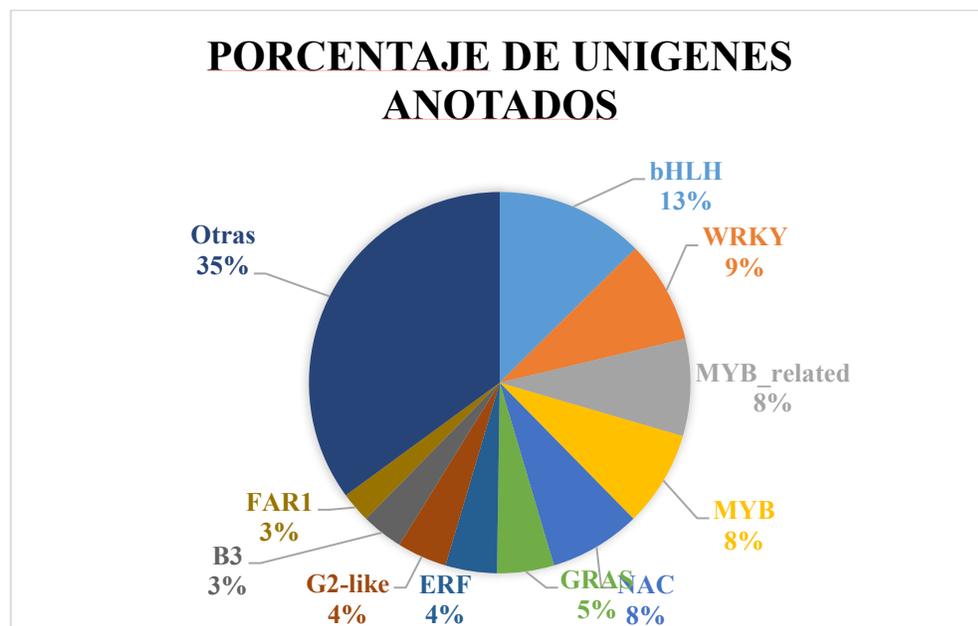


Figura 10. Porcentaje de cada familia de factores de transcripción anotados en el transcriptoma *E. nitens x E. globulus*.

De los 855 factores de transcripción anotados, estos se distribuyeron en 24 especies diferentes, donde *E. grandis* abarcó 80,82% de genes homólogos, otra especie que se encuentra altamente representada es *Eucalyptus camaldulensis* con un 16,26%, lo que sumado a *E. grandis* da un total de 97,14% de representatividad, las otras 22 especies no supera el 0,35% de representatividad cada una (Tabla 2).

Tabla 2. Número y porcentaje de FT anotados en el híbrido *E. nitens x E. globulus*, por especie con la base de datos PTFDB y secuencias de péptidos y aminoácidos de *E. grandis*.

Especie	Número de FT alineados por especies.	Porcentaje (%)
<i>Eucalyptus grandis</i>	691	80,82
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	139	16,26
<i>Fragaria vesca</i>	3	0,35
<i>Coffea canephora</i>	2	0,23
<i>Actinidia chinensis</i>	1	0,12
<i>Catharanthus roseus</i>	1	0,12
<i>Cucumis sativus</i>	1	0,12
<i>Fragaria x ananassa</i>	1	0,12
<i>Gossypium raimondii</i>	1	0,12
<i>Ipomoea trifida</i>	1	0,12
<i>Jatropha curcas</i>	1	0,12
<i>Juglans regia</i>	1	0,12
<i>Leersia perrieri</i>	1	0,12
<i>Lotus japonicus</i>	1	0,12
<i>Manihot esculenta</i>	1	0,12
<i>Medicago truncatula</i>	1	0,12
<i>Morus notabilis</i>	1	0,12
<i>Nicotiana tabacum</i>	1	0,12
<i>Oryza longistaminata</i>	1	0,12
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1	0,12
<i>Ricinus communis</i>	1	0,12
<i>Theobroma cacao</i>	1	0,12
<i>Vitis vinifera</i>	1	0,12
<i>Ziziphus jujuba</i>	1	0,12
TOTAL	855	100%

5.3 Análisis de expresión génica diferencial.

El análisis de abundancia del transcriptoma en cada condición se puede observar en la Tabla 3 donde hay un total de 17712 genes en la condición NA, de los cuales 844 corresponden a factores de transcripción, 17620 genes en AAH, donde 841 son factores de transcripción, y, 17421 genes en ADH, con 844 correspondientes a factores de transcripción.

La abundancia de factores de transcripción por condición varía levemente entre ellas, siendo bHLH la familia que se encontró mayoritariamente en las tres condiciones, seguido por WRKY y MYB_related (Apéndice 15).

Tabla 3. Abundancia del Número total de genes y factores de transcripción del híbrido *E. nitens x E. globulus* por condición NA (No aclimatado), AAH (Aclimatado antes de helada), ADH (Aclimatado después de helada).

Tipo de secuencias	Expresados en NA	Expresados en AAH	Expresados en ADH
N° total de genes	16868	16779	16585
N° total de factores de FT	844	841	836
TOTAL	17712	17620	17421

A través del análisis con DESeq2 se identificó un set de genes diferencialmente expresados en las siguientes comparaciones pareadas: NA vs AAH, AAH vs ADH, y NA vs ADH, se consideró un gen diferencialmente expresado aquellos que presentaron un Log₂FoldChange (Log₂FC) superior a 1, e inferior a -1, en ambos casos con padj 0.05. El número total de genes diferencialmente expresado en NA vs AAH fue de 833 de manera positiva y 1632 negativos, en AAH vs ADH fueron 231 positivos, y, 708 negativos, y, en NA vs ADH, 1047 positivos, y, 3056 negativos, tal y como se puede observar en la Tabla 4. El total de genes diferencialmente expresados fueron graficados través de gráficos de MA como se observa en las figuras 11A, 12A y 13A.

Tabla 4. Número total de genes y factores de transcripción del híbrido *E. nitens x E. globulus* expresados de manera diferencial con Log₂FC superior a 1, e inferior a -1, padj 0.05, por condiciones pareadas. NA vs AAH, AAH vs ADH, NA vs ADH.

Comparaciones de tratamientos	NA vs AAH		AAH vs ADH		NA vs ADH	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Tipo de regulación						
Genes	775	1555	222	641	998	2885
Factores de transcripción	58	77	9	67	49	171
TOTAL	833	1632	231	708	1047	3056

En base a los gráficos de PCA (Figura 11B; 12B; 13B) se logra apreciar que en las interacciones de condiciones NA vs AAH y NA vs ADH existe cercanía de las réplicas de los tratamientos bajo la segunda componente principal (PCA2), y en la interacción de condiciones “AAH vs ADH” existe agrupación de las réplicas bajo la primera componente principal (PCA 1).

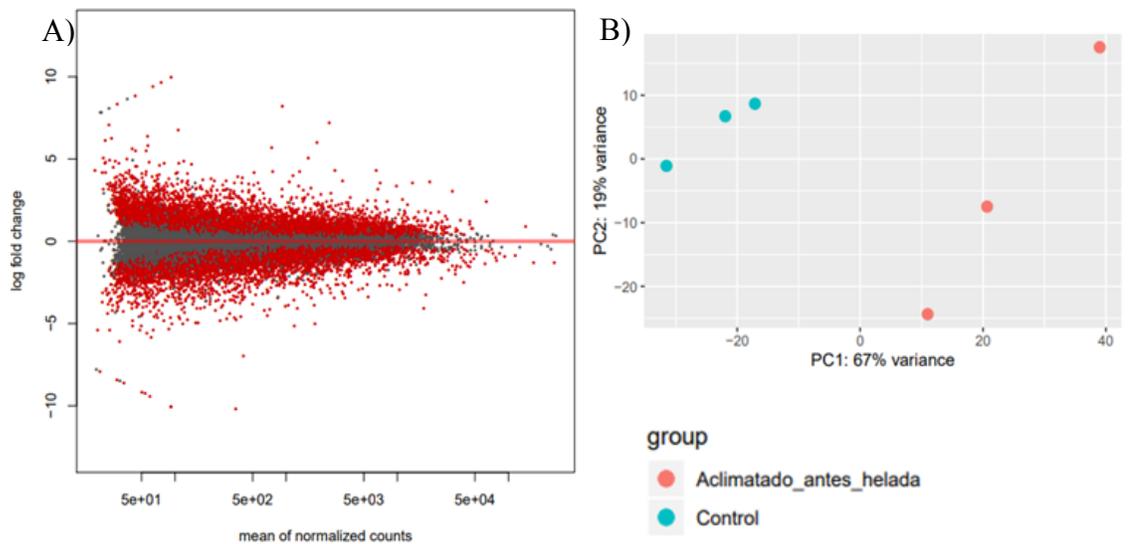


Figura 11. (A) MA de expresión diferencial. En el eje X se representa la media de la expresión entre condiciones NA y AAH, y, en el eje Y se representa el Log_2FC . Los valores de Log_2FC superior a 1 e inferior a -1, y padj 0.05 se encuentran representados en color rojo. (B) Análisis de componentes principales (PCA) de los datos normalizados de cada replica. No aclimatada vs Aclimatada antes de helada. PC1: Primera componente principal, PC2: Segunda componente principal.

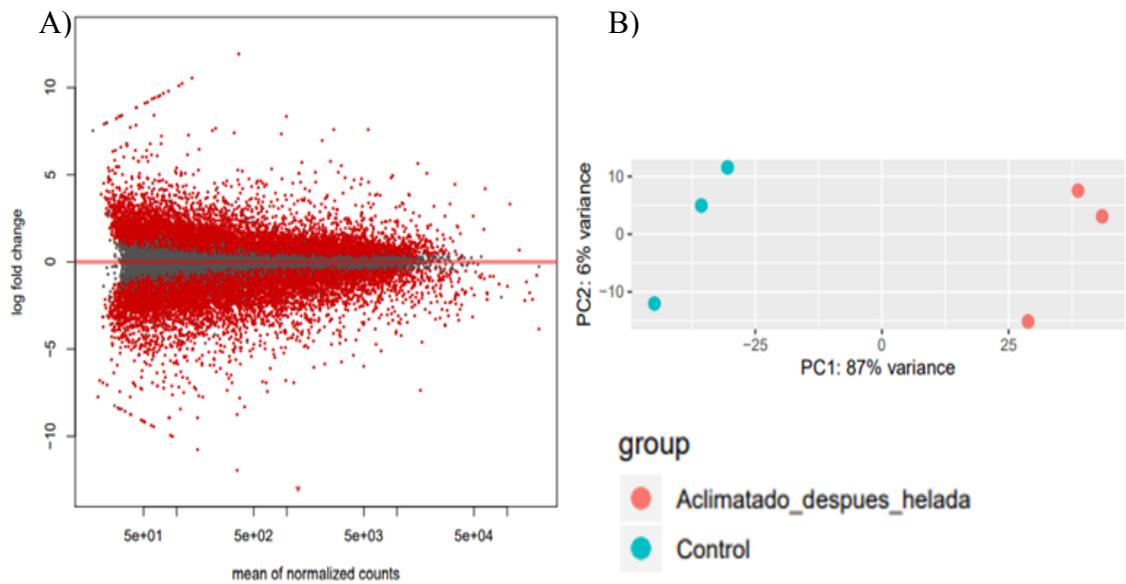


Figura 12. (A) MA de expresión diferencial. En el eje X se representa la media de la expresión entre condiciones NA y ADH, y, en el eje Y se representa el Log_2FC . Los valores de Log_2FC superior a 1 e inferior a -1, y padj 0.05 se encuentran representados en color rojo. (B) Análisis de componentes principales (PCA) de los datos normalizados de cada replica. No aclimatada vs Aclimatada después de helada. PC1: Primera componente principal, PC2: Segunda componente principal.

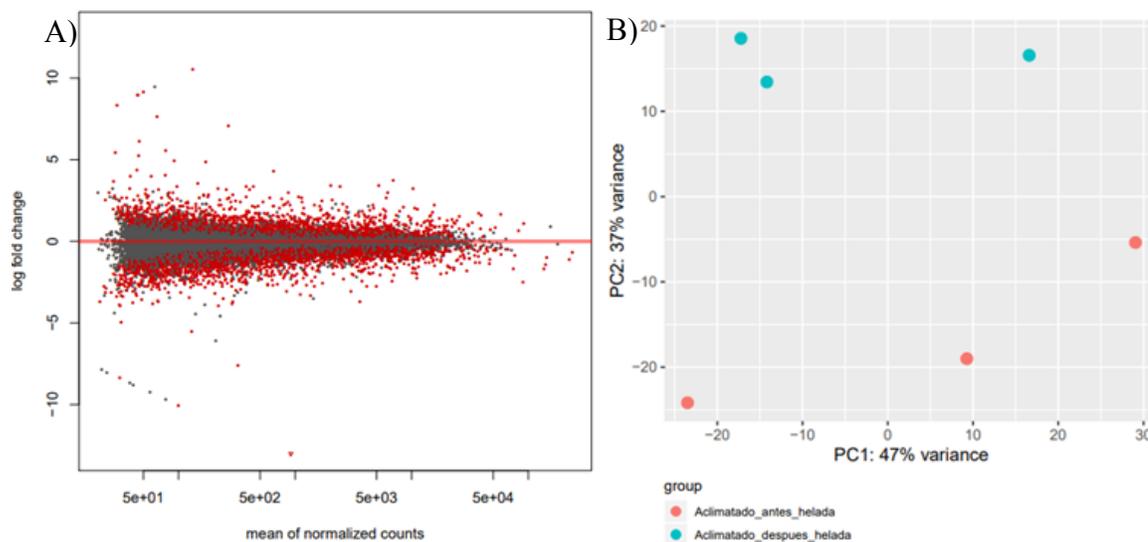


Figura 13. (A) MA de expresión diferencial. En el eje X se representa la media de la expresión entre condiciones AAH y ADH, y, en el eje Y se representa el Log_2FC . Los valores de Log_2FC superior a 1 e inferior a -1, y $\text{padj} < 0.05$ se encuentran representados en color rojo. (B) Análisis de componentes principales (PCA) de los datos normalizados de cada replica. Acimatada antes de helada vs Acimatada después de helada. PC1: Primera componente principal, PC2: Segunda componente principal.

De los 855 factores de transcripción anotados en la combinación de tratamientos NA vs AAH, 77 mostraron un valor de Log_2FC inferior a -1,00 (Tabla 4), donde EnigloWRKY 69 mostró tener un valor de Log_2FC más negativo de -4,70 (Apéndice 16), por otro lado 58 factores de transcripción mostraron un valor Log_2FC superior a 1,00 (Tabla 4), donde EnigloM-type MADS 10 mostró tener un valor de Log_2FC más positivo de 8,86 (Apéndice 16). Por otro lado, la figura 14 muestra la totalidad de factores de transcripción expresados diferencialmente tanto como de manera positiva (upregulated) como negativa (downregulated). Al comparar los tratamientos NA vs AAH las familias que presentaron mayor número de factores de transcripción regulados de manera negativa fueron bHLH (14), WRKY (13), NAC (8), MYB (7), MYB_related (5) y GRAS (5), por otro lado, las familias de factores de transcripción que presentaron mayor número de factores de

transcripción regulados positivamente fueron NAC (8), bHLH (7), MYB (7), ERF (6), M-TYPE_MADS (4) y WRKY (3).

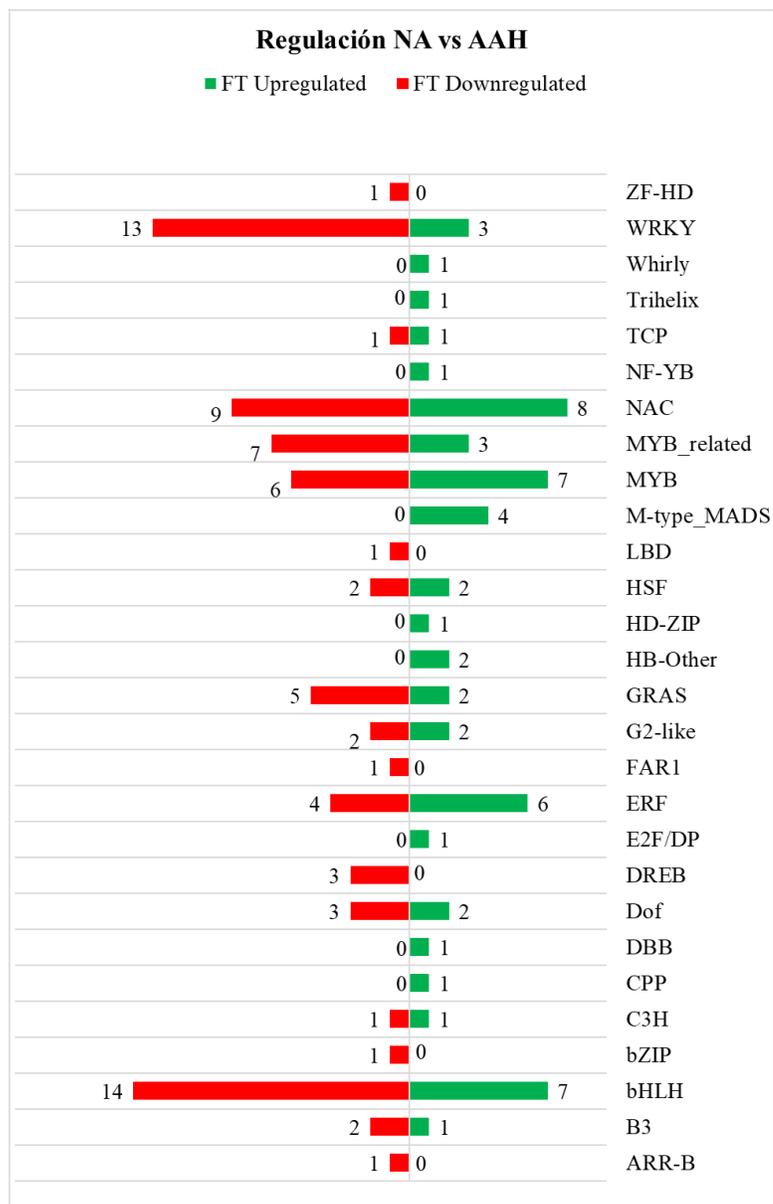


Figura 14. Factores de transcripción diferencialmente expresados en la combinación de tratamientos No aclimatado (NA) vs Aclimatado antes de helada (AAH). Upregulated: $\text{Log}_2\text{FC} = -1$; $\text{padj} = 0.05$. Downregulated: $\text{Log}_2\text{FC} = -1$; $\text{padj} = 0.05$.

En la combinación de tratamientos AAH vs ADH, 67 mostraron un valor de Log₂FC inferior a -1,00 (Tabla 4), donde EnigloNF-YC 5 mostró tener un valor de Log₂FC más negativo de -3,76 (Apéndice 17), por otro lado 9 factores de transcripción mostraron un valor Log₂FC superior a 1,00 (Tabla 4), donde EniglobHLH 3 mostró tener un valor de Log₂FC más positivo de 7,64 (Apéndice 17). Por otro lado, la figura 15 muestra la totalidad de factores de transcripción expresados diferencialmente tanto como de manera positiva como negativa. Al comparar los AAH vsADH las familias que presentaron mayor número de factores de transcripción regulados de manera negativa fueron bHLH (11), WRKY (11), HB-OTHER (6), ERF (5), MYB_related (5) y B3 (4), por otro lado, las familias de factores de transcripción que presentaron mayor número de factores de transcripción regulados positivamente fueron bHLH (3), GRAS (2), WRKY (1), NAC (1), MYB (1) y CAMTA (1).

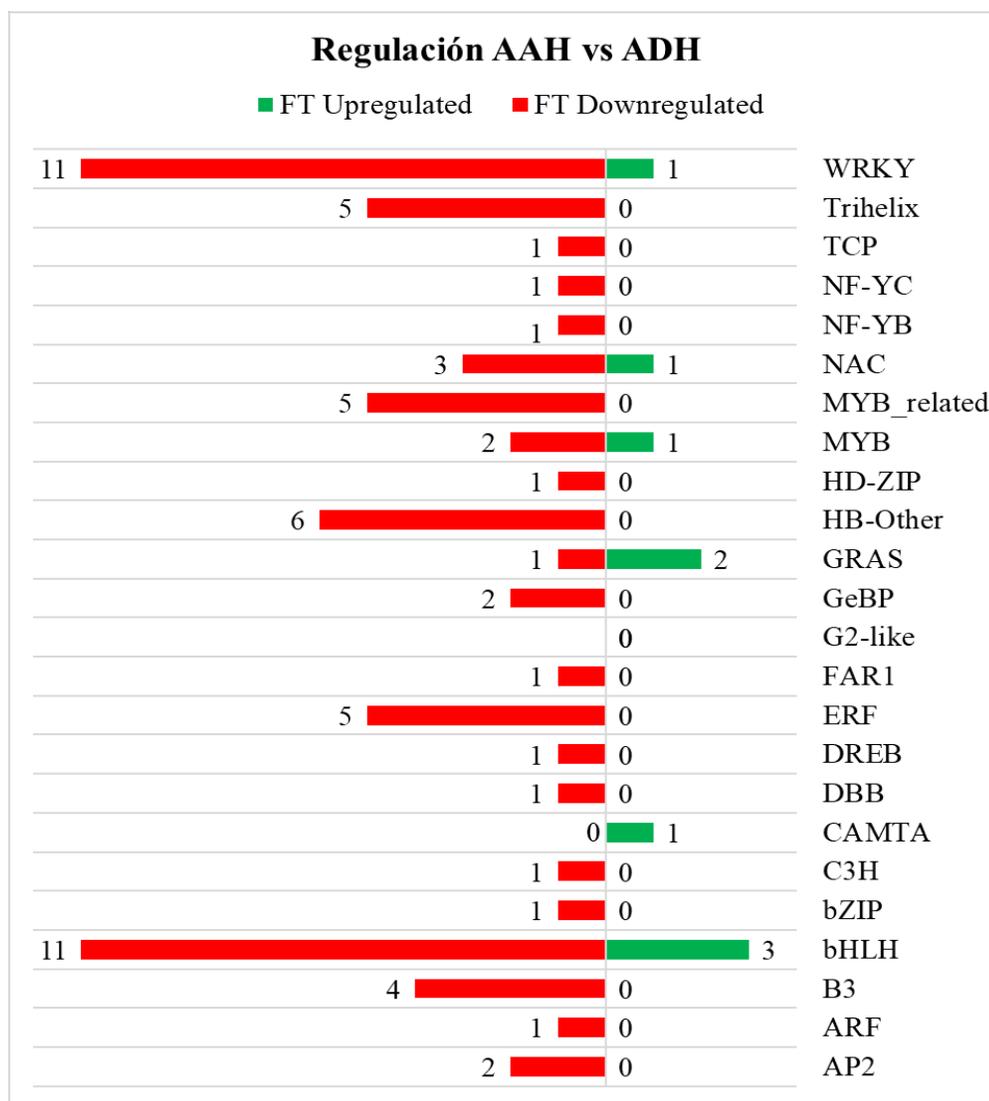


Figura 15. Factores de transcripción diferencialmente expresados en la combinación de tratamientos Aclimatado antes de helada (AAH) vs Aclimatado después de helada (ADH). Upregulated: $\text{Log}_2\text{FC} = -1$; $\text{padj} = 0.05$. Downregulated: $\text{Log}_2\text{FC} = 1$; $\text{padj} = 0.05$.

En la combinación de tratamientos AAH vs ADH, 171 mostraron un valor de Log_2FC inferior a -1,00 (Tabla 4), donde EnigloLBD 6 mostró tener un valor de Log_2FC más negativo de -5,65 (Apéndice 18), por otro lado 49 factores de transcripción mostraron un valor Log_2FC superior a 1,00 (Tabla 4), donde EniglobHLH 3 mostró tener un valor de Log_2FC más positivo de 8,41 (Apéndice 18). Por otro lado, la figura 16 muestra la

totalidad de factores de transcripción expresados diferencialmente tanto como de manera positiva como negativa. Al comparar los tratamientos NA vs ADH las familias que presentaron mayor número de factores de transcripción regulados de manera negativa fueron bHLH (26), WRKY (26), MYB_related (18), MYB (11), NAC (11) y GRAS (10), por otro lado, las familias de factores de transcripción que presentaron mayor número de factores de transcripción regulados positivamente fueron NAC (7), bHLH (6), ERF (5), MYB (5), WRKY (4) y HSF (4).

Por otro lado las familias CO-Like, GATA, GRF, MIKC_MADS, NF-YA, SRS, YABBY, presentaron regulación negativa de al menos un factor de transcripción, solo en esta interacción de condiciones.

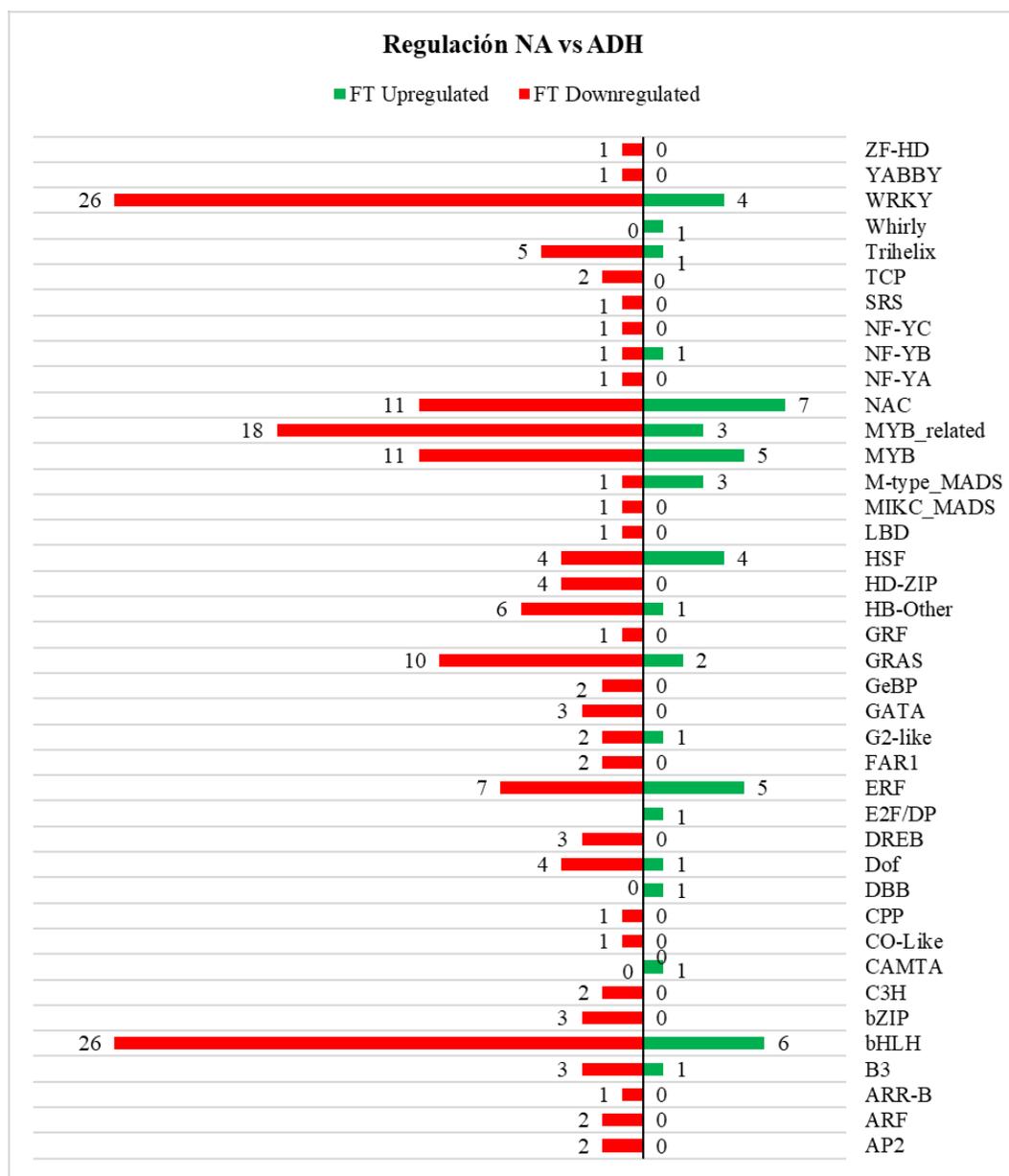


Figura 16. Factores de transcripción diferencialmente expresados en la combinación de tratamientos No aclimatados (NA) vs Aclimatado después de helada (ADH). Upregulated: $\text{Log}_2\text{FC} = -1$; $\text{padj} = 0.05$. Downregulated: $\text{Log}_2\text{FC} = -1$; $\text{padj} = 0.05$.

El mapa de calor de a figura 17 agrupa los factores de transcripción expresados de manera diferencial, con valores de L_2FC superior a 1 e inferior a -1. Se puede observar factores

de transcripción expresados diferencialmente en “NA vs AAH”, “AAH vs ADH” y “NA vs ADH” de manera independiente, como también en, “NA vs AAH / NA vs ADH”, “NA vs AAH / AAH vs ADH”, “AAH vs ADH / NA vs ADH”, y, “NA vs AAH / AAH vs ADH / NA vs ADH”, esta última se puede observar en la figura 18.

En la figura 17 se puede observar que existen mayor cantidad de factores de transcripción expresándose en NA vs ADH, los cuales se pueden observar en el apéndice 18.

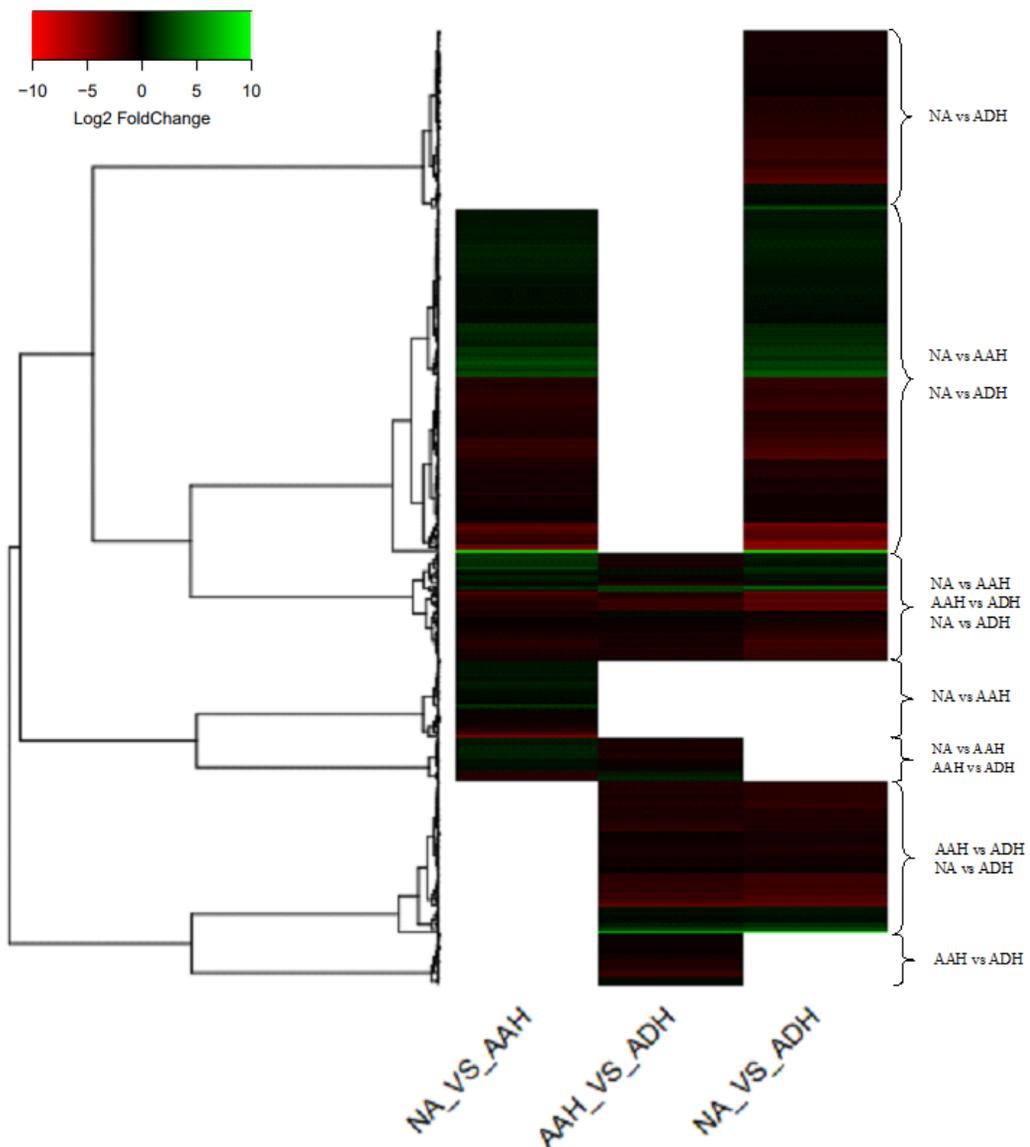


Figura 17. Mapa de calor de factores de transcripción diferencialmente expresados basado en la correlación de datos de expresión normalizados (L2FC) en alguna de las combinaciones de condiciones con valores de p_{adj} inferior a 0.05, Los colores representan el nivel de expresión por factor de transcripción de más expresado (verde) a menos expresado (rojo).

*Los factores de transcripción con valores de p_{adj} no significativo (superior a 0.05) fueron graficados en coloración blanca.

En la Figura 18 se puede observar el comportamiento de los factores de transcripción que se expresaron en las condiciones (NA, AAH y ADH), se observa que miembros de las familias DBB, ERF, G2-like, GRF, HD-ZIP, M-type_MADS muestran un L2FC positivo en las condiciones NA vs AAH y NA vs ADH.

También se observaron más miembros de las familias MYB, WRKY, bHLH, GRAS, Dof y NAC con L2FC negativo en las condiciones NA vs AAH y NA vs ADH, en cambio miembros de las familias MYB_related mostraron un L2FC mayoritariamente positivo en las condiciones NA vs AAH y NA vs ADH

La figura 18 nos muestra que la mayoría de los factores de transcripción mostraron una disminución en su expresión basado en la coloración roja mostrada en AAH vs ADH, donde solo 8 factores de transcripción mostraron un aumento de expresión basada en la coloración verde de AAH vs ADH.

Eniglo.HB-Other 4 y Eniglo.bHLH 92 mostraron un L2FC positivo en NA vs AAH, el cual cambio a un L2FC negativo en NA vs ADH,

Eniglo.GRAS 30 presentó un L2FC negativo en NA vs AAH, el cual cambio a positivo en NA vs ADH.

Eniglo.MYB 39, Eniglo.WRKY 5, Eniglo.NAC 13. Eniglo.MYB_related 31, Eniglo.GRAS 23 presentaron expresión positiva en NA vs AAH y NA vs ADH, y en el delta observado en AAH vs ADH.

Eniglo.NAC 11 presentó expresión negativa en NA vs AAH y NA vs ADH, y en el delta observado en AAH vs ADH Presentó un aumento de expresión basado en la coloración verde de este

Eniglo.GRAS 30, Eniglo.MYB 39, y, Eniglo.WRKY 5 exhibieron un aumento de expresión mayor, basado en la coloración verde intensa observada en AAH vs ADH calor de la figura 16, por otro lado, miembros de las familias WRKY, bHLH y B3 mostraron una disminución de expresión basado en la coloración roja más intensa en el mapa de calor

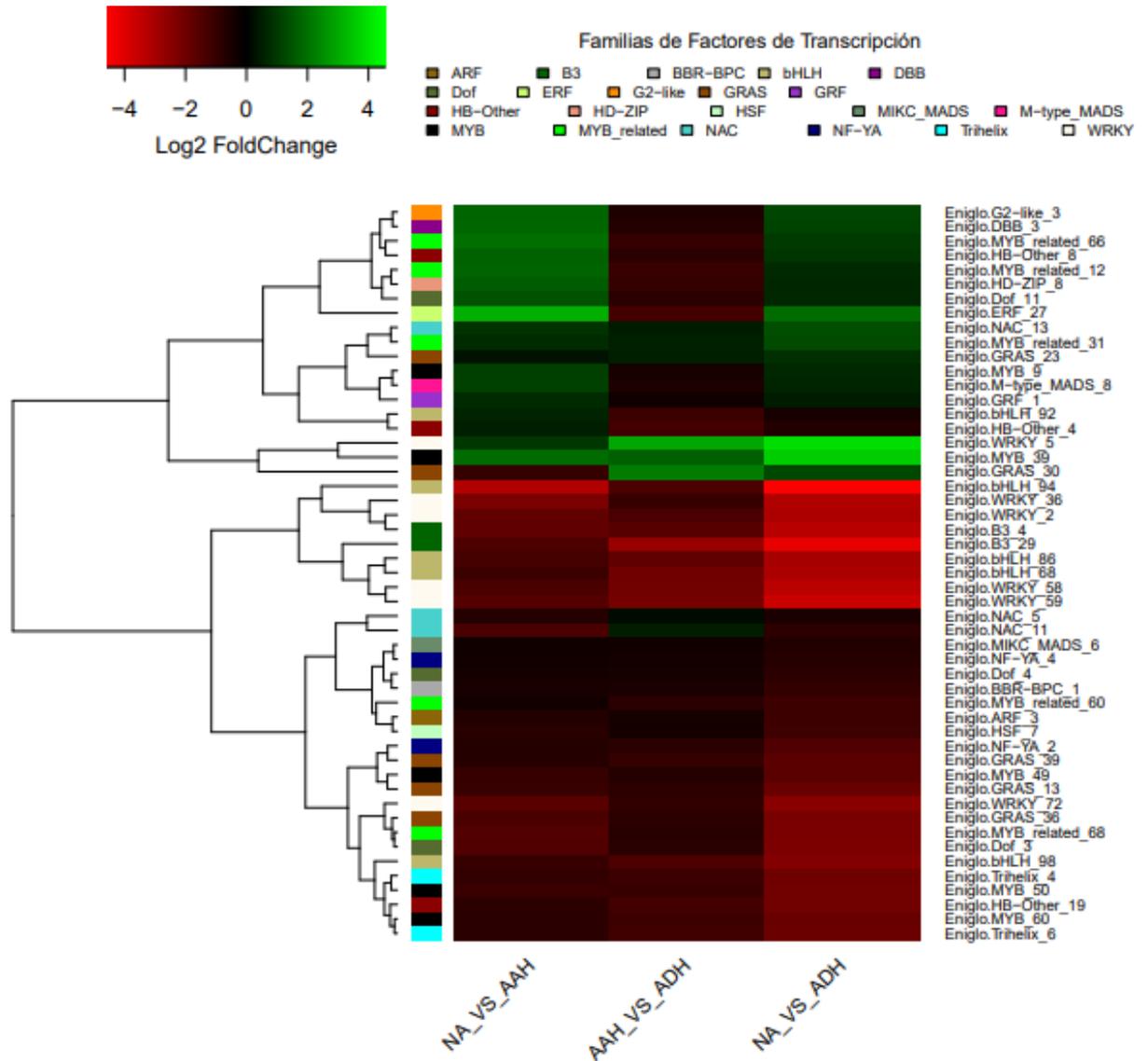


Figura 18. Mapa de calor de factores de transcripción diferencialmente expresados basado en la correlación de datos de expresión normalizados (L2FC) en NA vs AAH, AAH vs ADH, y, NA vs ADH con valores de padj inferior a 0.05, Los colores representan el nivel de expresión por factor de transcripción de más expresado (verde) a menos expresado (rojo).

5.4 Redes de interacción.

Para comprender de mejor manera la interacción de los factores de transcripción, se calcularon redes de interacción con la base de datos de *A. thaliana* (Ecotipo Columbia) v.3.5.182 de BIOGRID y fueron posteriormente graficadas en cytoscape.

En los resultados se destaca genes objetivos (genes a los cuales los factores de transcripción anotados mostraron interacción en base a las redes de interacción generadas en los apéndices 7, 8 y 9) con un Log_2FC superior a 1 e inferior a -1 donde tres factores de transcripción de la familia NAC mostraron regulación en varios genes objetivos, EnigloNAC 42 presentó regulación positiva sobre 4 genes y regulación negativa en 11 en la interacción de condiciones NA vs AAH, EnigloNAC 37 presentó regulación positiva sobre 4 genes y regulación negativa en 7, en la interacción de condiciones AAH vs ADH, y, EnigloNAC 6 presentó regulación positiva sobre 9 genes y regulación negativa en 18 en la interacción de condiciones NA vs ADH (Tabla 5). Por otro lado, EnigloE2F/DP 1 presento regulación positiva en 1 gen objetivo y regulación negativa en 1 en dos interacciones de condiciones “NA vs AAH”, y “NA vs ADH”, el último factor de transcripción que se destacó es EnigloARF 3 el cual solo mostro regulación negativa en 4 genes objetivos con un Log_2FC inferior a -1 (Tabla 5)

Tabla 5. Interacción de factores de transcripción que presentaron mayor número de genes objetivos en redes predichas con la base de datos *A. thaliana* (Ecotipo Columbia) v.3.5.182 de BIOGRID. Genes objetivos que presentaron Log₂FC superior a 1 e inferior a -1, y padj 0.05.

Interacción de condiciones	Factor de transcripción	Log ₂ FC factor de transcripción	Tipo de regulación en genes objetivos	Número de genes objetivos
NA vs AAH	EnigloNAC 42	-1,02	Positiva	4
			Negativa	11
	EnigloE2F/DP 1	1,25	Positiva	1
AAH vs ADH	EnigloNAC 37	1	Negativa	1
			Positiva	4
	EnigloNAC 6	-1,29	Positiva	4
NA vs ADH	EnigloNAC 6	-1,29	Negativa	7
			Positiva	9
	EnigloE2F/DP 1	1,44	Positiva	18
			Negativa	1
	EnigloARF 3	-1,07	Positiva	1
Negativa	4			

Aquellos genes diferencialmente expresados en las condiciones NA vs AAH (Apéndice 19) mostraron dos agrupaciones principales que relacionaba un factor de transcripción con variados genes objetivos, el primer grupo, el cual es visible en la figura 19, es EnigloNAC 42, el cual genera la red más grande bajo estas condiciones, seguido por EnigloE2F/DP 1 (Figura 20) quien presentó una red más pequeña que la anterior mostrando regulación sobre los genes objetivos con descripción “*Subunidad reguladora del proteasoma 26S*”

N7", "acetil-CoA carboxylasa / biotin carboxilasa", " Repeticiones que contienen proteínas relacionadas a armadillo/beta-catenina-like", "Casete de unión a ATP, sub-familia E, miembro 1", "Proteína asociada a BRAHMA de 155 KDA", " Quinasa dependiente de ciclina 2", " Quinasa dependiente de ciclina 7", " Proteína de procesamiento previo a ARNr TSR1", "Proteína TAF-3, Isoforma A"

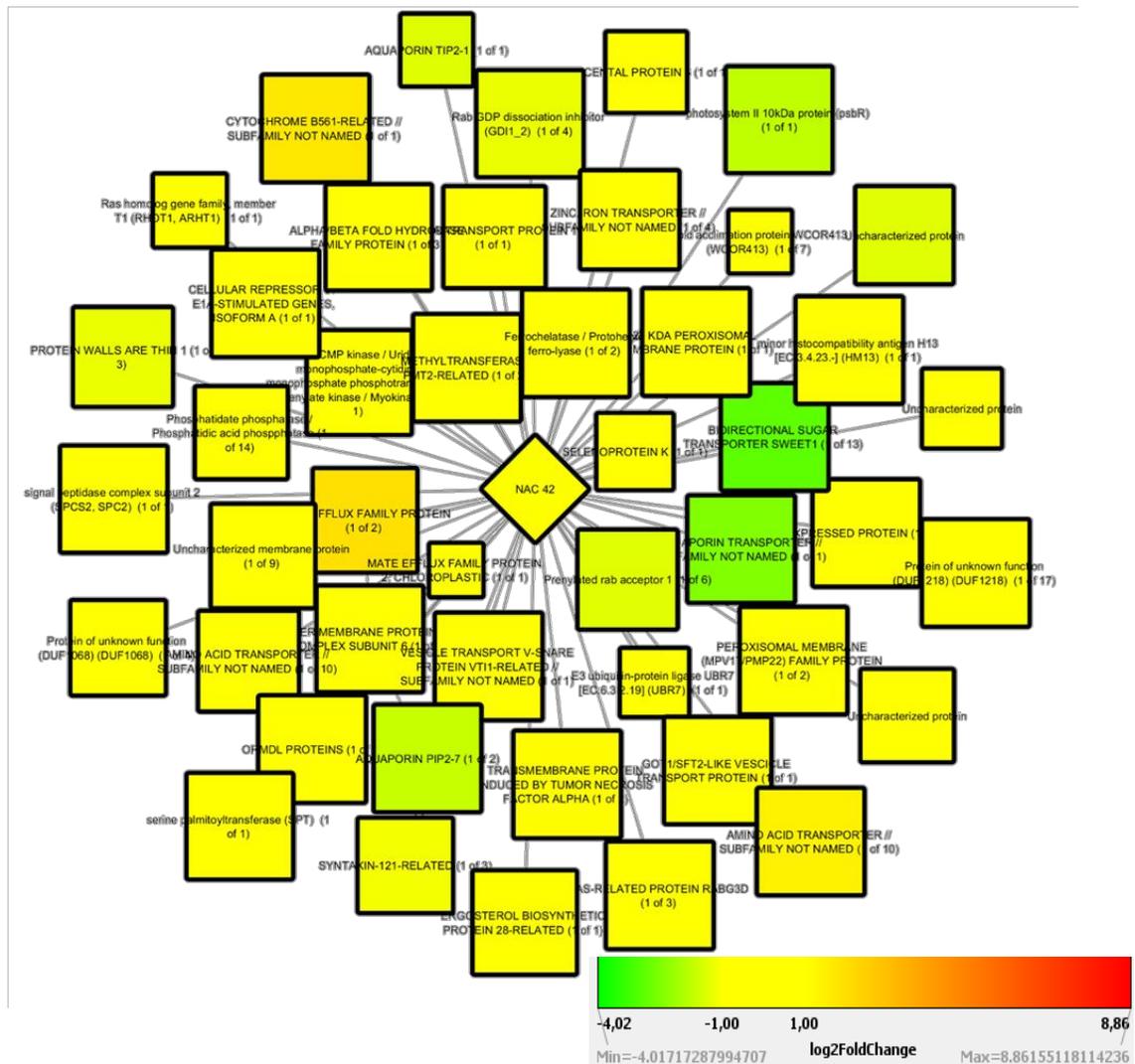


Figura 19. Interactoma entre NA y AAH del factor de transcripción anotado en el híbrido *E. nitens x E. globulus* EnigloNAC 42 con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*. Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.

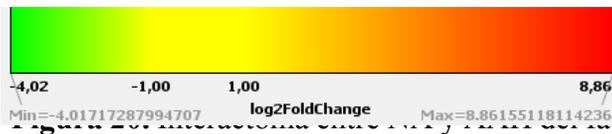
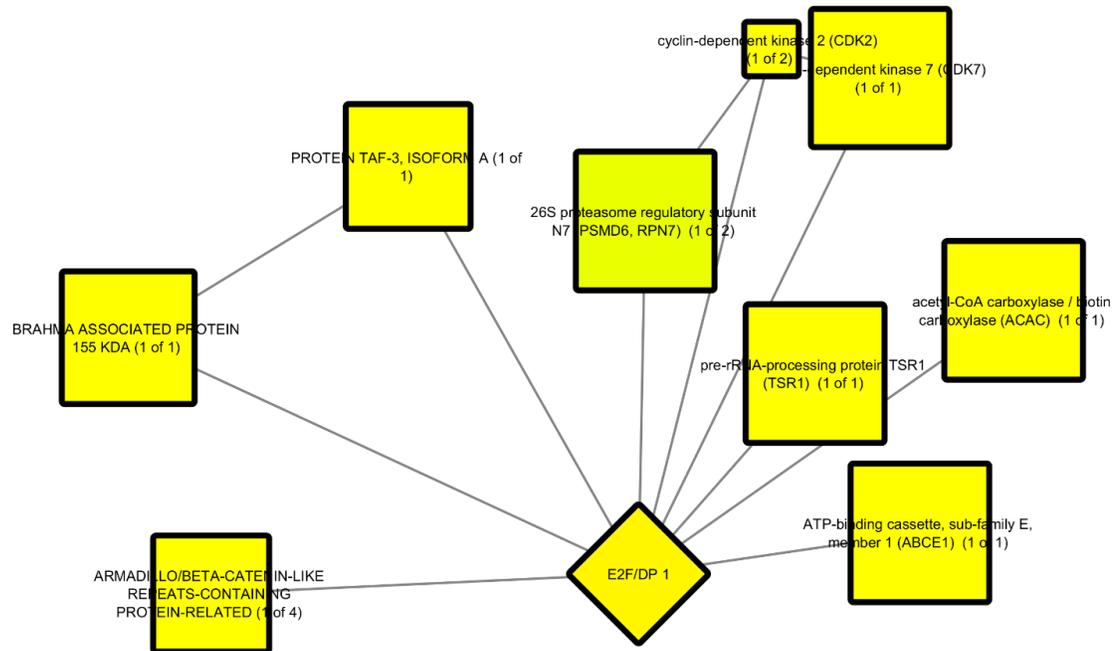


Figura 21. Red de interacción del factor de transcripción anotado en el híbrido *E. nitens x E. globulus* EnigloE2F/DP 1 con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*. Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.

La red de interacción de AAH vs ADH (Apéndice 20) mostró una sola agrupación principal relacionaba algún factor de transcripción con variados genes objetivos, el cual es visible en la figura 21, siendo esta la de EnigloNAC 37, el cual genera la red más grande bajo estas condiciones.

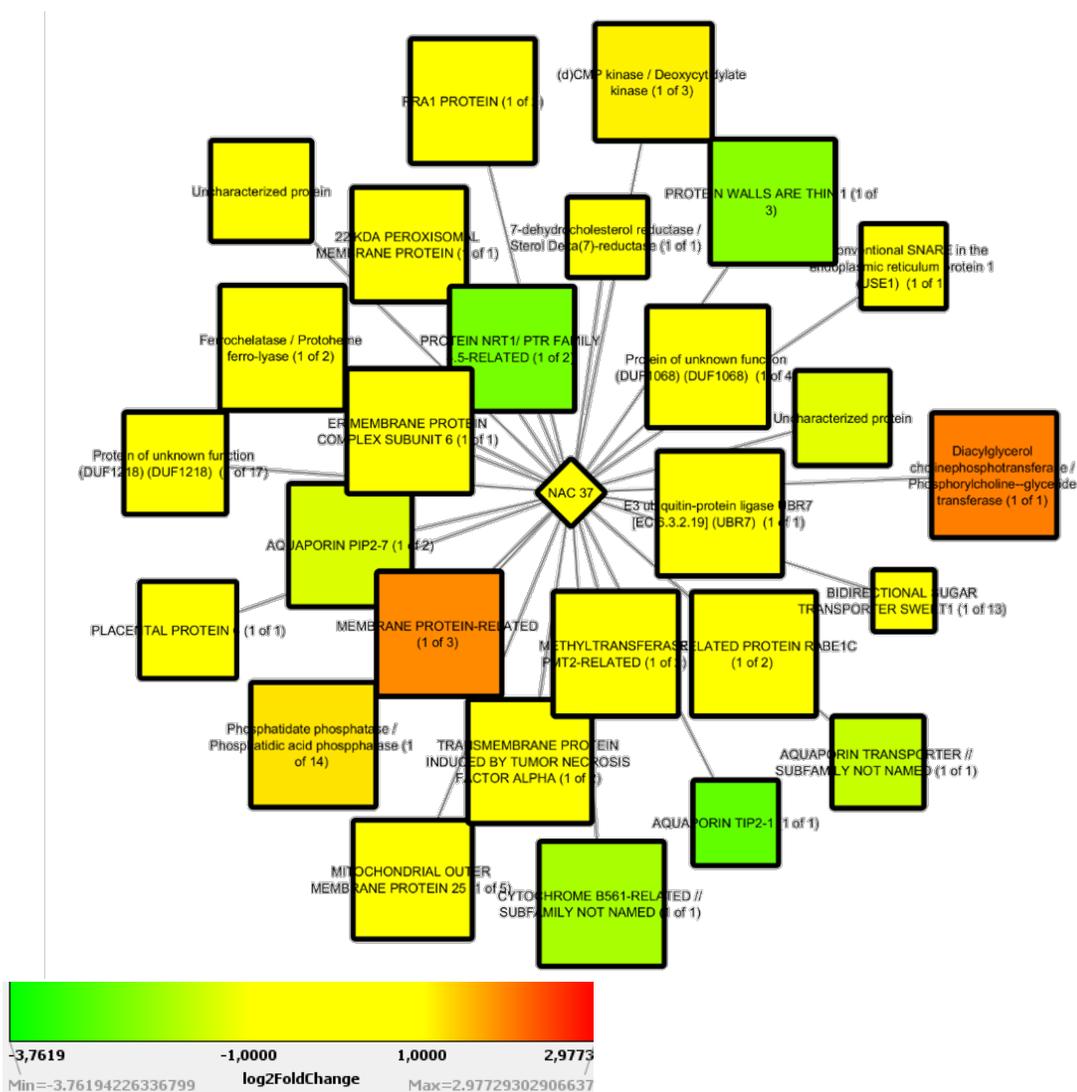


Figura 21. Interactoma entre AAH y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido *E. nitens x E. globulus* EnigloNAC 37 con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*. Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.

La red de interacción de NA vs ADH (Apéndice 21) mostró tres agrupaciones principales que relacionaba algún factor de transcripción con variados genes objetivos, el primer grupo, el cual es visible en la figura 22, es de EnigloNAC 6, el cual genera la red más grande bajo estas condiciones y se encuentra regulando diferentes genes objetivos de

manera negativa como positiva como también se puede apreciar en la tabla 8, la agrupación que le sigue es EnigloE2F/DP 1 (Figura 23) quien presento una red más pequeña que la anterior mostrando regulación sobre los genes objetivos con descripción “Subunidad reguladora del proteasoma 26S N7”, “Acetil-CoA carboxylasa / biotin carboxilasa”, “Repeticiones que contienen proteínas relacionadas a armadillo/beta-catenina-like”, “Casete de unión a ATP, sub-familia E, miembro 1”, “Proteína asociada a BRAHMA de 155 KDA”, “Quinasa dependiente de ciclina”, “Quinasa dependiente de ciclina 2” “Quinasa dependiente de ciclina 7”, “Proteína de procesamiento previo a ARNr TSR1”, adicionalmente, se observa una red más pequeña, la de EnigloARF 3 quien se encuentra regulando con un Log_2FC inferior a -1 a 4 genes objetivos relacionados con proteínas sensibles a auxinas como muestra la figura 24.

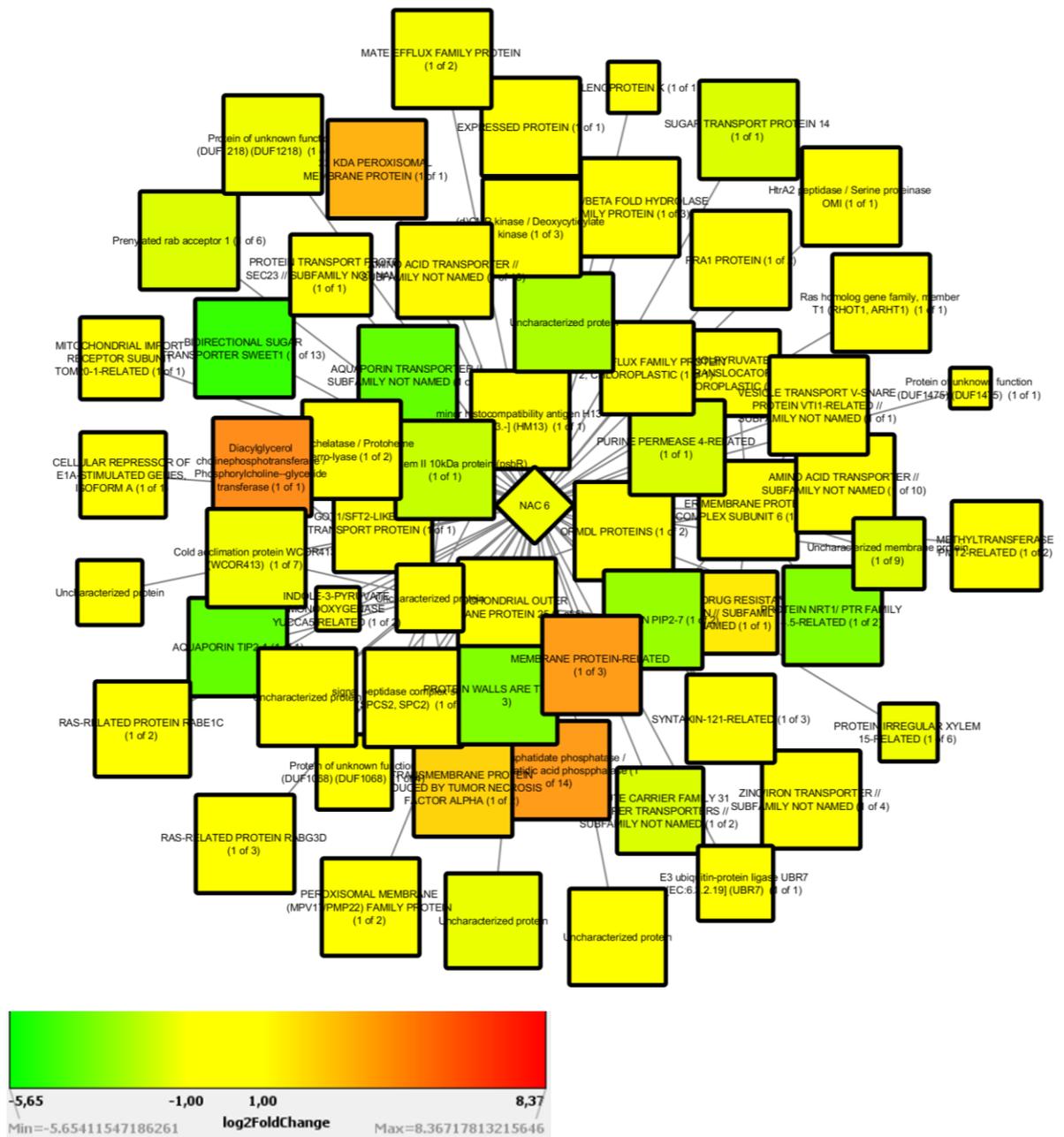


Figura 22. Interactoma entre NA y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido *E. nitens x E. globulus* EnigloNAC 6 con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*. Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.

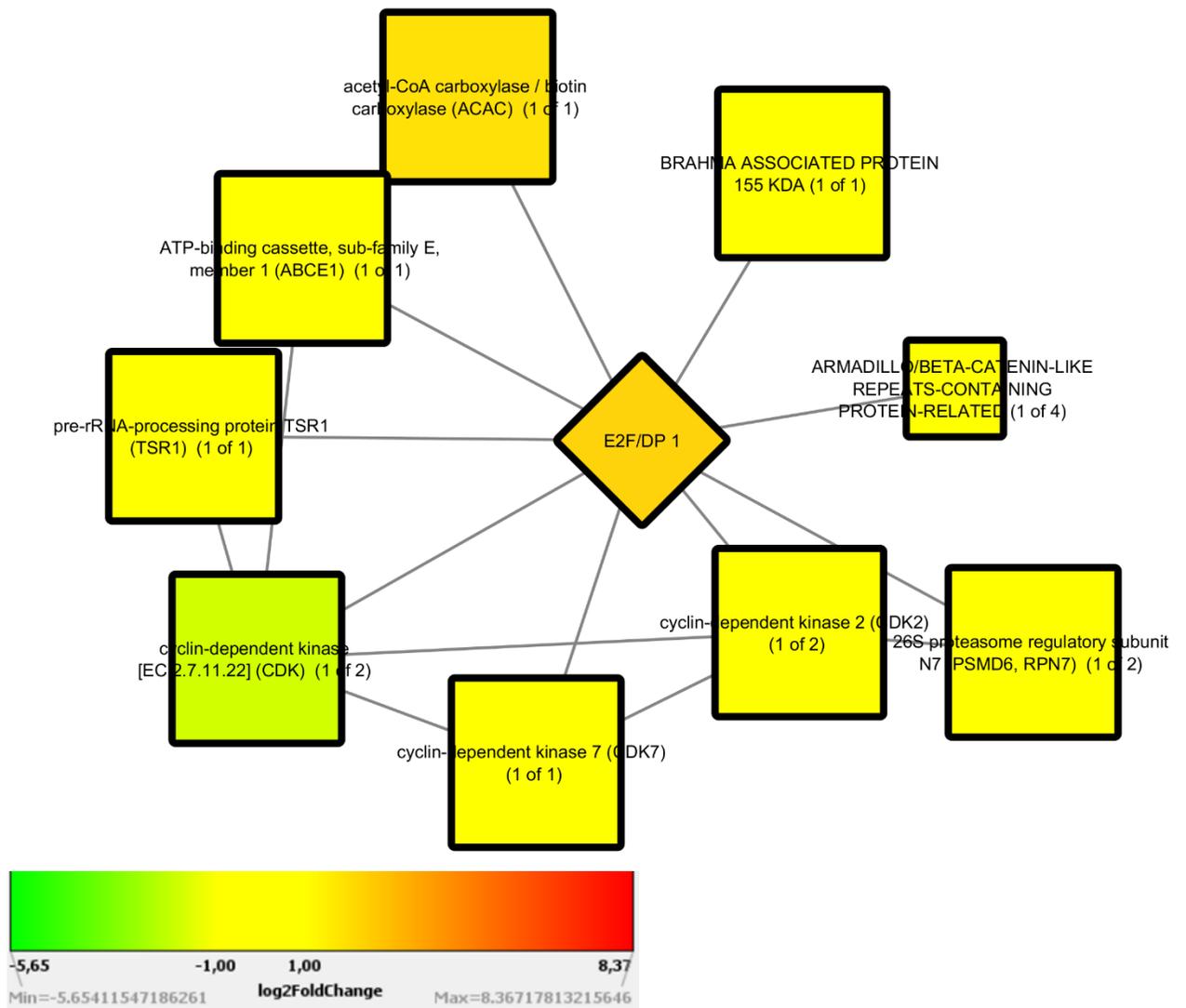


Figura 23. Interactoma entre NA y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido *E. nitens x E. globulus* EnigloE2F/DP 1 con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*. Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.

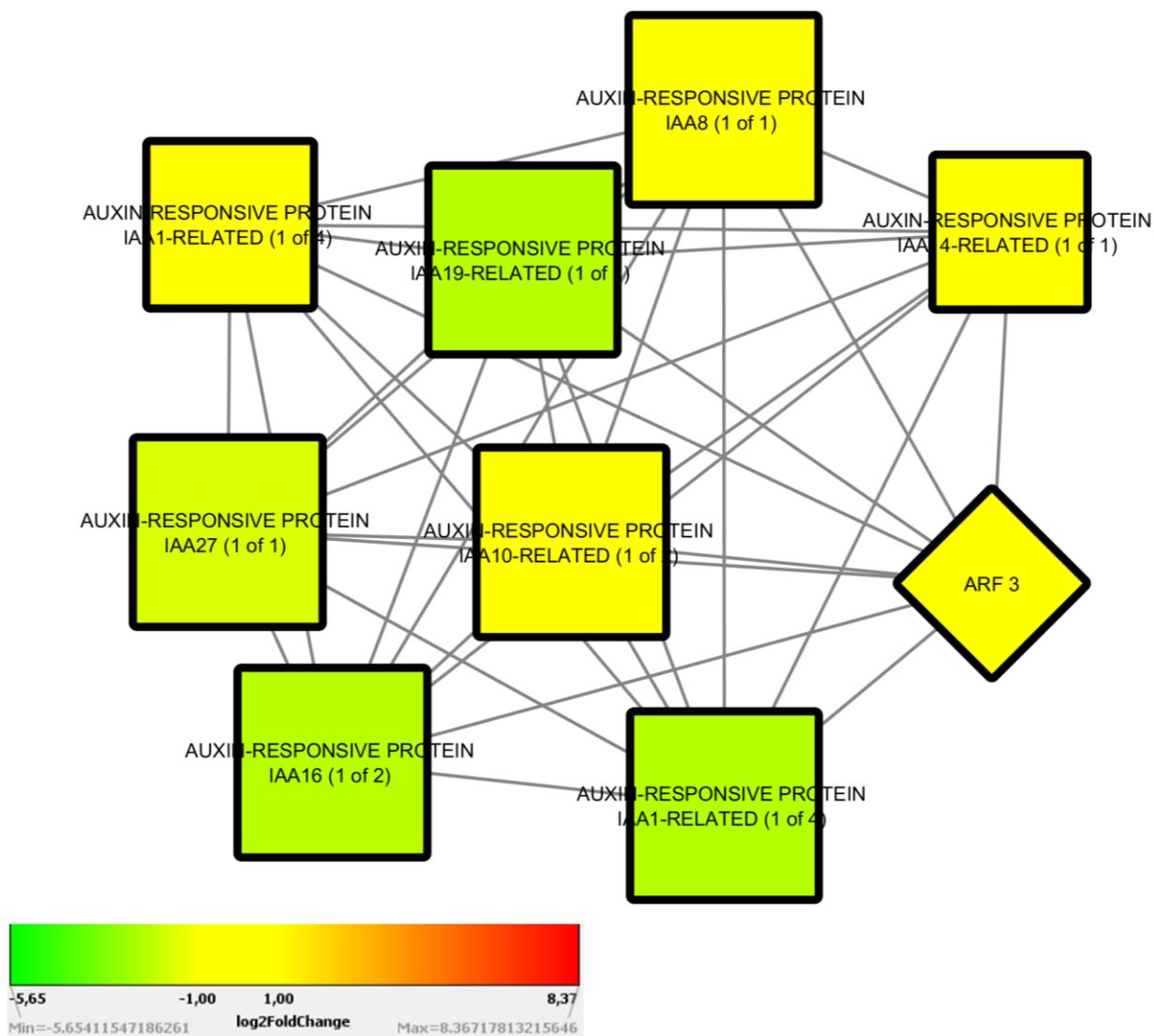


Figura 24. Interactoma entre NA y ADH del factor de transcripción anotado en el híbrido *E. nitens x E. globulus* EnigloARF 3 con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*. Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.

5.5 Ontología genética.

El análisis de enriquecimiento por ontología genética por procesos biológico de los factores de transcripción anotados dio como resultado una lista larga de terminologías, las cuales y gracias al uso de REVIGO fueron simplificadas y posteriormente agrupadas de manera gráfica utilizando cytoscape. Los términos que presentaron una intensidad roja más tenue, indicando mayor significancia de p-value, con un tamaño de burbuja más grande indicando mayor frecuencia del término, bajo las condiciones AAH vs ADH, fueron “Regulación biológica” y “regulación del proceso metabólico de compuestos nitrogenados” en regulación positiva de los factores de transcripción, y “Regulación biológica” y “Regulación de procesos metabólicos” en regulación negativa de factores de transcripción. (Figura 25).

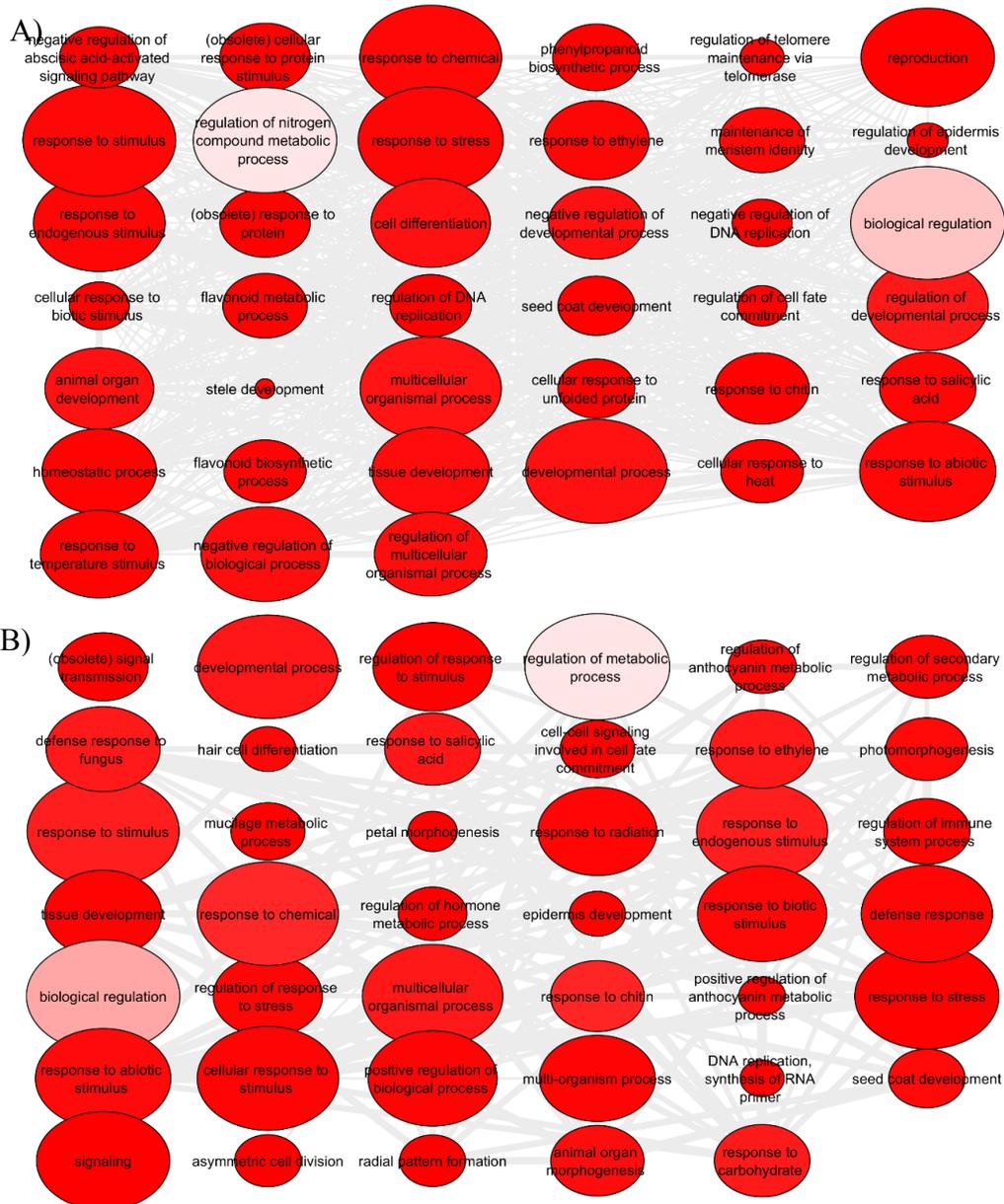


Figura 25. Enriquecimiento por ontología genética (GO) sobrerrepresentados de procesos biológicos, en las interacción NA vs AAH en BinGO, reducido por REVIGO y graficado en cytoscape. La transparencia del color rojo es la significancia de p-value, y el tamaño de burbuja indica la frecuencia del término. A) Factores de transcripción regulados positivamente, B) Factores de transcripción regulados negativamente.

Los términos que presentaron una intensidad roja más tenue, con un tamaño de burbuja más grande bajo las condiciones AAH vs ADH, fueron “Regulación biológica” y “Regulación de procesos metabólicos” en regulación positiva de los factores de transcripción, y “Regulación biológica” y “Regulación de procesos metabólicos” en regulación negativa de factores de transcripción. (Figura 26).

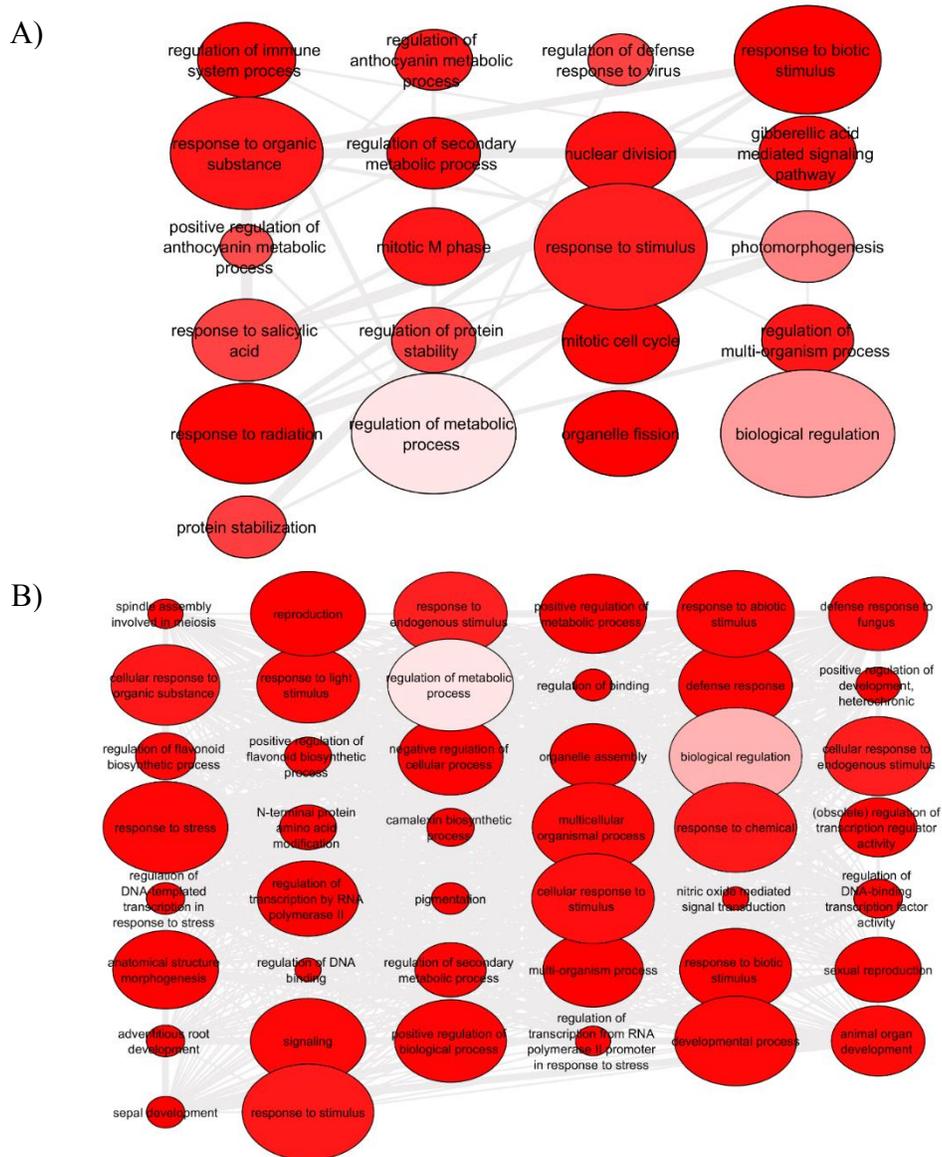


Figura 26. Enriquecimiento por ontología genética (GO) sobrerrepresentados de procesos biológicos, en las interacciones AAH vs ADH en BinGO, reducido por REVIGO y

graficado en cytoscape. La transparencia del color rojo es la significancia de p-value, y el tamaño de burbuja indica la frecuencia del término. A) Factores de transcripción regulados positivamente, B) Factores de transcripción regulados negativamente.

Los términos que presentaron una intensidad roja más tenue, con un tamaño de burbuja más grande, indicando mayor significancia de p-value bajo las condiciones NA vs ADH, fueron “Regulación biológica” y “Regulación de procesos metabólicos primarios” en regulación positiva de los factores de transcripción, y “Regulación biológica” y “Regulación de procesos metabólicos” en regulación negativa de factores de transcripción. (Figura 27).

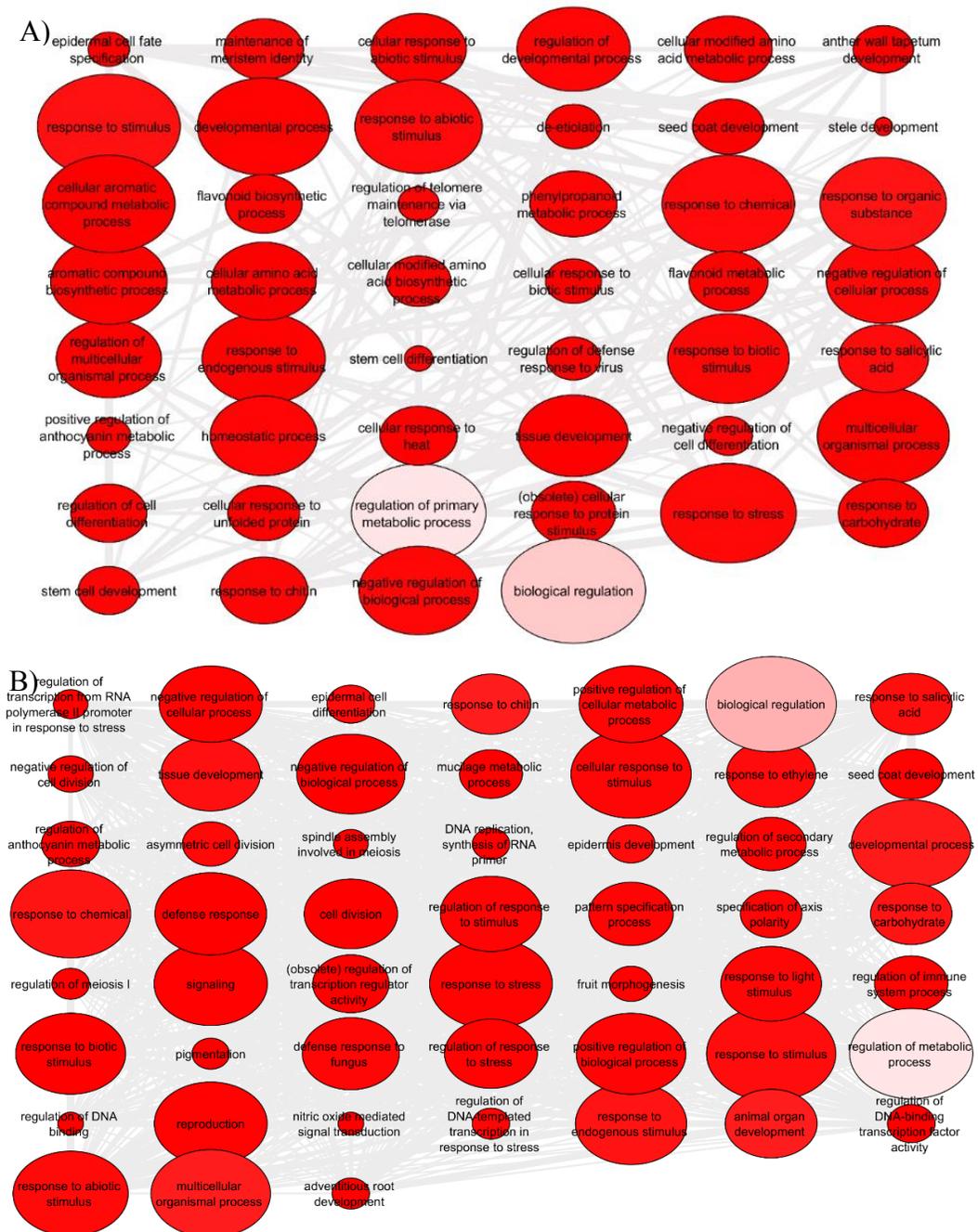


Figura 27: Enriquecimiento por ontología genética (GO) sobrerrepresentados de procesos biológicos, en las interacción NA vs ADH en BinGO, reducido por REVIGO y graficado en cytoscape. La transparencia del color rojo es la significancia de p-value, y el tamaño de burbuja indica la frecuencia del término. A) Factores de transcripción regulados positivamente, B) Factores de transcripción regulados negativamente.

VI DISCUSION

Las bibliotecas generadas con una profundidad de 34 millones de lecturas fueron superiores a lo generado por Mudalkar en 2014, donde en su ensamble *de novo* del transcriptoma de *Camelia sativae* obtuvieron bibliotecas con 10.83 millones de lecturas con secuencias de largo máximo de 101pb, y a Mahmood en 2020, donde obtuvieron bibliotecas que van de los 18 a 26 millones de lecturas en el ensamble *de novo* del transcriptoma *Secale cereale* L.

La tecnología *Illumina* presenta ciertas complicaciones al momento de utilizar adaptadores y primers durante la secuenciación, siendo una de las causales del ruido observable antes del recorte de los adaptadores, (Barbero, 2019). Gracias al recorte del extremo 5' se obtiene una mejor calidad de datos, al permitir recuperar lecturas que con este contaminante pueden ser perjudiciales para análisis posteriores (Williams, 2016).

El número total de factores de transcripción anotados es similar a los encontrados en *Eucalyptus globulus* donde las familias de factores de transcripción con más representantes fueron bHLH seguido por MYB_related, NAC, ERF y WRKY en hoja y bHLH, NAC, MYB_related, MYB, bZIP en raiz, bajo aclimatacion por frio. (Aguayo et al 2019) en especies como *Ammopiptanthus mongolicus*, *Vaccinium spp.*, *Broussonetia papyrifera*, *Saccharum spontaneum* se encontró que la familia bHLH era parte de las más representadas bajo tratamiento por frío al igual que nuestro experimento. (Die and Rowland, 2014; Pang et al, 2013; Peng et al, 2015; Selvarajan et al 2018)

De los 1191 factores de transcripción anotados, la especie que presento mayor cantidad de genes homólogos fué *E. grandis*, esto gracias al uso de todas las secuencias codificantes y de aminoácidos de *E. grandis* V2.0, lo que jugó un papel fundamental a la hora de anotar las familias de factores de transcripción. Tal y como comenta Bolger en 2018 el uso de secuencias de referencia (proteínas y/o de nucleótidos), de bases de datos como Phytozome da como resultado una anotación funcional superior. Otra especie que se encuentra representada con un porcentaje considerable es *E. camaldulensis*. Donde se puede observar un caso similar en un estudio transcriptómico *de novo* en *Secale cereale* L. arrojo que los 10 organismos principales relacionados con la anotación funcional

pertencen a *Triticeae* con un 92% de representatividad, siendo esta la misma familia a la que pertenece *S. cereale* (Mahmood, 2020).

Las familias que presentaron mayor representatividad en cuanto a expresión diferencial fueron bHLH, WRKY, NAC, MYB, y ERF siendo estas similares a lo ocurrido durante aclimatación por frío en *E. nitens* donde AP2, MYB, WRKY, y bHLH, mostraron mayor representatividad entre sus tratamientos (Gaete-Loyola, 2017). También esto se puede observar en *Broussonetia papyrifera* donde se vio que las familias bHLH, WRKY, ERF, MYB, C2H2 y NAC, se expresaron diferencialmente durante estrés por bajas temperaturas (Peng, 2015).

Al observar el mapa de calor generado, se observa que EnigloWRKY 5, EnigloMYB_related 31, EnigloMYB 39, EnigloGRAS 30, EnigloGRAS 23, EnigloNAC 5, EnigloNAC 13, mostraron un aumento en la expresión, resultados similares se han obtenido en la identificación factores de transcripción en *E. globulus* y *E. nitens* bajo aclimatación por frío, donde se observó que algunos factores de transcripción WRKY y MYB mostraron un aumento de expresión bajo análisis de expresión diferencial *in silico*, los cuales fueron validados posteriormente mediante qRT-PCR (Aguayo 2019, Solís 2019). Por otro lado, se han descrito factores de transcripción de la familia GRAS involucrados en diversos estrés, como es el caso de *VaPAT1*, un factor de transcripción GRAS de *Vitis amurensis*, el cual fue sobreexpresado modulando una serie de genes relacionados con el aumento del contenido de prolina y azúcares solubles, mejorando la tolerancia al frío, sequía y alta salinidad, o el gen OsGRAS23 de *Oryza sativa*, el cual demostró inducir genes de respuesta a sequía y tolerancia al estrés oxidativo (Xu et al 2015, Yuan et al 2016).

Esto refuerza el rol importante de las familias bHLH, WRKY, NAC, MYB, y ERF bajo estrés por bajas temperaturas y congelamiento, dado que se tienen registros que el uso de secuencias de estas familias en plantas transgénicas de *A. thaliana* y *Nicotiana tabacum* están involucradas en la señalización, otorgando resistencia en respuestas a estas condiciones (Dai 2007, Li 2014, Xu 2014, Zhang 2009, Zhang 2016)

HSF fueron expresados tanto en la comparación NA vs AAH, como en NA vs ADH, esto es importante dado que estos factores de transcripción se encuentran involucrados en la detección y señalización de diversos procesos como crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en las respuestas a otros estrés abióticos como baja temperatura, salinidad, la sequía y altas temperaturas (Xu, 2020). En *E. nitens* se describe que diversos HSF fueron expresados y regulados de manera positiva durante la aclimatación por frío (Gaete-Loyola, 2017). También se han descritos variados HSF que están involucrados solo en aclimatación por frío como lo son HsfA6a y HsfA6b de *A. thaliana* los cuales están involucrados en estrés osmótico, salino y frío (von Koskull-Döring, 2007).

El resultado de las redes de interacción arrojó que EnigloNAC 42, EnigloNAC 37, y EnigloNAC 6 presentaron mayor interacción con genes objetivos, esto se debe a que miembros de la familia NAC pueden participar en múltiples procesos biológicos a la vez, entre las que se incluyen respuestas al estrés biótico y abiótico, la transducción de señales y el desarrollo, como es el caso de CaNAC36 en *Capsicum annuum* L. donde se observó que este factor de transcripción interactuó con 48 genes diferentes (Diao, 2018). A su vez en *Prunus mume* se describieron en base a redes de interacción que diversos factores de transcripción de la familia NAC están involucrados en variados estímulos, uno de estos es PmNAC017, el cual se encuentra relacionado con respuesta a ABA, sal, sequía, frío y estrés oxidativo, y PmNAC041 el cual se encuentra involucrado en la regulación de la diferenciación de los vasos del xilema, el desarrollo de las plantas y la respuesta al estrés (Zhuo, 2018).

Por otro lado el factor de transcripción EnigloE2F/DP 1 presentó redes de interacción similares tanto en “NA vs AAH” como en “NA vs ADH”, donde sus genes objetivos participan en diversos procesos dentro de la planta, “Subunidad reguladora del proteasoma 26S N7” es una proteína que degrada ubiquitina, “acetil-CoA carboxilasa / biotín carboxilasa” proteína que juega un papel importante en el desarrollo de meristemas apicales, “Repeticiones que contienen proteínas relacionadas a armadillo/beta-catenina-like” quienes están involucrados en la arquitectura de la pared celular, “Casete de unión a ATP, sub-familia E, miembro 1” proteína involucrada en la supresión endógena de ARN

de interferencia, "Proteína asociada a BRAHMA de 155 KDA" participa en la regulación de la transcripción, la replicación y reparación del ADN y el ciclo celular, " Quinasa dependiente de ciclina" coordina la división celular, la expansión celular y el crecimiento de órganos, " Proteína de procesamiento previo a ARNr TSR1" Proteína necesaria para el procesamiento de pre-ARNr 20S, "Proteína TAF-3, Isoforma A" quien está involucrada en el desarrollo vegetativo y reproductivo (Baud 2003, Farrona 2004, Fu 1999, Kärblane 2015, Kumar 2017, Sarnowska 2013, Ungar 2009, Valenzuela 2021). En *Moso bamboo* se identificaron diversos factores de transcripción E2F/DP, los cuales presentaron estar relacionados con respuesta fotoperiódica, señalización hormonal, el crecimiento de meristemas, jugando un papel importante en el crecimiento de sus brotes (Li, 2020).

Finalmente se pudo observar que en la interacción de tratamientos "NA vs ADH" EnigloARF 3, presentó regulación negativa en proteínas sensibles a auxinas, dado que estas tienden a formar dímeros con factores de transcripción de la familia ARF inhibiendo la transcripción de genes activados por ARF (Luo, 2018).

El enriquecimiento por ontología genética muestra una dominancia por la terminología "regulación biológica", similar a lo obtenido en el análisis de la familia bHLH *Triticum aestivum L*, donde también se observó que "regulación biológica", fue parte de la categoría dominante (Wang, 2019). Por otro lado, el término "Regulación de procesos metabólicos" también mostro dominancia en la interacción de tratamientos, al igual que en el análisis de los factores de transcripción NAC en *Zea mays* sometidos a estrés por sequía y rehidratación (Wang, 2020).

VII CONCLUSIONES

El estudio bioinformático arrojó que las familias mayormente representadas en el transcriptoma fueron bHLH, WRKY, MYb-related, MYB y NAC seguidos por GRAS y ERF, las cuales también arrojaron mayor cantidad de genes regulados bajo aclimatación por frío.

El análisis de expresión diferencial presentó un gran número de genes diferencialmente expresados, donde se puede proponer que los factores de transcripción EnigloWRKY 5, EnigloMYB_related 31, EnigloMYB 39, EnigloGRAS 23, EnigloGRAS 30, EnigloNAC 13 (cambio significativo en la expresión desde AAH a ADH) , EnigloNAC 42, EnigloNAC 37, EnigloNAC 6, y EnigloE2F/DP 1 (relacionados en múltiples procesos biológicos) y EnigloARF 3 (relacionado con proteínas sensibles a auxinas), son candidatos para estudios de qRT-PCR. Futuros estudios orientados en la validación in vitro de estos genes y su análisis funcional, podría corroborar su rol en la regulación de la aclimatación por baja temperatura.

VIII BIBLIOGRAFIA

1. Acevedo, E. 2008. Efectos del Establecimiento en el Crecimiento y Rentabilidad de Plantaciones de Eucalyptus en el Sur de Chile. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
2. Aguayo, P., Lagos, C., Conejera, D., Medina, D., Fernández, M., & Valenzuela, S. 2019. Transcriptome-wide identification of WRKY family genes and their expression under cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. *Trees*, 33(5), 1313-1327.
3. Barbero Aparicio, J. A. 2019. Desarrollo y despliegue de un workflow para el análisis genómico de *Campylobacter Jejuni* (Master's thesis).
4. Barrios, D., García, V., Osorio, L., Isaza, N., Palacio, J., García, F., & Sánchez, A., 2004. Análisis de Diversidad Genética de Colecciones élite de Eucalyptus, por medio de Marcadores Moleculares Microsatélites. *Fitotécnia Colombiana*, 4: 96-106 pp.
5. Baud, S., Guyon, V., Kronenberger, J., Wuillème, S., Miquel, M., Caboche, M., ... & Rochat, C. 2003. Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33(1), 75-86.
6. Bolger, M. E., Arsova, B., & Usadel, B. 2018. Plant genome and transcriptome annotations: from misconceptions to simple solutions. *Briefings in bioinformatics*, 19(3), 437-449.
7. Dai, X., Xu, Y., Ma, Q., Xu, W., Wang, T., Xue, Y., & Chong, K. 2007. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143(4), 1739-1751.
8. Diao, W., Snyder, J. C., Wang, S., Liu, J., Pan, B., Guo, G., ... & Dawood, M. H. S. A. (2018). Genome-wide analyses of the NAC transcription factor gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.): chromosome location, phylogeny, structure, expression patterns, cis-elements in the promoter, and interaction network. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1028.
9. Die, J. V., & Rowland, L. J. 2014. Elucidating cold acclimation pathway in blueberry by transcriptome profiling. *Environmental and experimental botany*, 106, 87-98.

10. El Kayal, W., Navarro, M., Marque, G., Keller, G., Marque, C., & Teulieres, C., 2006. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *Journal of experimental botany*, 57(10), 2455-2469 pp.
11. Farrona, S., Hurtado, L., Bowman, J. L., & Reyes, J. C. 2004. The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog *AtBRM* controls shoot development and flowering. *Development*, 131(20), 4965-4975.
12. Fu, H., Girod, P. A., Doelling, J. H., van Nocker, S., Hochstrasser, M., Finley, D., & Vierstra, R. D. 1999. Structure and functional analyses of the 26S proteasome subunits from plants—Plant 26S proteasome. *Molecular biology reports*, 26(1), 137-146.
13. Gaete-Loyola, J., Lagos, C., Beltrán, M. F., Valenzuela, S., Emhart, V., & Fernández, M., 2017. Transcriptome profiling of *Eucalyptus nitens* reveals deeper insight into the molecular mechanism of cold acclimation and deacclimation process. *Tree genetics & genomes*, 13(2): 37 p.
14. Granados-Sánchez, D., & López-Ríos, G. F., 2007. Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 13(2):143-156 pp.
15. FAOSTAT, 2019. Forestal Producción y Comercio: Los 10 países principales - Pulpa para papel + (Total) Exportaciones - Candidad. Obtenida el 01 de mayo del 2019, de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/FO/visualize>.
16. Fernández M, Troncoso V, Valenzuela S (2015) Transcriptome profile in response to frost tolerance in *Eucalyptus globulus*. *Plant Mol Biol Rep* 33:1472–1485.
17. Grattapaglia, D., 2008. Genomics of *Eucalyptus*, a global tree for energy, paper, and wood. In *Genomics of Tropical Crop Plants*. Springer, New York, NY. 259-298 pp.
18. Gutiérrez Caro, B., 2006. Contribución al desarrollo de una raza de *Eucalyptus globulus* Labill tolerante al frío. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
19. Guzmán, F., & Yanitza, J., 2006. Efecto de ayudantes en pulpaje kraft basados en antraquinonas y surfactante sobre pulpa de *Eucalyptus nitens*. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales.
20. INFOR, 2018. Evolución de las plantaciones forestales en Chile. Forestación y Reforestación. Ciencia e Investigación Forestal INFOR Chile. Volumen 24 N° 3. Instituto Forestal, Santiago, Chile. 27 p.

21. Ipinza, Roberto & Gutierrez Caro, Braulio & Brand, Maria., 2014. Mejoramiento genético de Eucaliptos historia, avances y tendencias. 10.13140/RG.2.1.4247.0244.
22. Kärblane, K., Gerassimenko, J., Nigul, L., Piirsoo, A., Smialowska, A., Vinkel, K., ... & Sarmiento, C. 2015. ABCE1 is a highly conserved RNA silencing suppressor. *PloS one*, 10(2), e0116702.
23. Kumar, N., & Larkin, J. C. 2017. Why do plants need so many cyclin-dependent kinase inhibitors?. *Plant signaling & behavior*, 12(2), e1282021.
24. Li, L., Shi, Q., & Gao, J. 2020. Genome-Wide Identification and Functional Characterization of the PheE2F/DP Gene Family in Moso Bamboo.
25. Li, X. L., Yang, X., Hu, Y. X., Yu, X. D., & Li, Q. L. 2014. A novel NAC transcription factor from Suaeda liaotungensis K. enhanced transgenic Arabidopsis drought, salt, and cold stress tolerance. *Plant cell reports*, 33(5), 767-778.
26. Luo, J., Zhou, J. J., & Zhang, J. Z. 2018. Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 259.
27. Mahmood, K., Orabi, J., Kristensen, P. S., Sarup, P., Jørgensen, L. N., & Jahoor, A. 2020. De novo transcriptome assembly, functional annotation, and expression profiling of rye (*Secale cereale* L.) hybrids inoculated with ergot (*Claviceps purpurea*). *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
28. Morales, S. M., Villar-Salvador, P., García-Fayos, P., Rubira, J. L. P., de la Naturaleza, C., & Desertificación, C. S. D. I. 2003. Influencia de la localización del vivero sobre la resistencia a la helada y el desarrollo en campo de *Quercus ilex* spp. *ballota* L. *Revista Montes*, 74: 23-30 pp.
29. Mudalkar, S., Golla, R., Ghatty, S., & Reddy, A. R. 2014. De novo transcriptome analysis of an imminent biofuel crop, *Camelina sativa* L. using Illumina GAII-X sequencing platform and identification of SSR markers. *Plant molecular biology*, 84(1-2), 159-171.
30. Navarrete Campos, D. O., 2017. Caracterización de genes CBF (c-repeat binding factors) de *Eucalyptus globulus* y su validación como genes candidatos que regulan la resistencia al frío mediante transformación genética en *Arabidopsis thaliana* (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales).

31. Pang, T., Ye, C. Y., Xia, X., & Yin, W. 2013. De novo sequencing and transcriptome analysis of the desert shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, during cold acclimation using Illumina/Solexa. *BMC genomics*, 14(1), 488.
32. Peng, X., Wu, Q., Teng, L., Tang, F., Pi, Z., & Shen, S. 2015. Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. *BMC plant biology*, 15(1), 1-14.
33. Sarnowska, E. A., Rolicka, A. T., Bucior, E., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A. R., ... & Sarnowski, T. J. 2013. DELLA-interacting SWI3C core subunit of switch/sucrose nonfermenting chromatin remodeling complex modulates gibberellin responses and hormonal cross talk in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 163(1), 305-317.
34. Selvarajan, D., Mohan, C., Dhandapani, V., Nerkar, G., Jayanarayanan, A. N., Mohanan, M. V., ... & Meena, M. 2018. Differential gene expression profiling through transcriptome approach of *Saccharum spontaneum* L. under low temperature stress reveals genes potentially involved in cold acclimation. *3 Biotech*, 8(4), 195.
35. Solís, M., Salas, A., Lagos, C., Valenzuela, S., Emhart, V., & Fernández, M. 2019. De Novo Transcriptome Assembly of *Eucalyptus nitens* and the Expression of R2R3-MYB Genes in Response to Cold Acclimation in *Eucalyptus* Spp. *Plant Molecular Biology Reporter*, 37(4), 376-388.
36. Ungar, L., Yosef, N., Sela, Y., Sharan, R., Ruppín, E., & Kupiec, M. 2009. A genome-wide screen for essential yeast genes that affect telomere length maintenance. *Nucleic acids research*, 37(12), 3840-3849.
37. Valenzuela, C. E., Ballesta, P., Ahmar, S., Fiaz, S., Heidari, P., Maldonado, C., & Mora-Poblete, F. 2021. Haplotype-and SNP-Based GWAS for Growth and Wood Quality Traits in *Eucalyptus cladocalyx* Trees under Arid Conditions. *Plants*, 10(1), 148.
38. von Koskull-Döring, P., Scharf, K. D., & Nover, L. 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in plant science*, 12(10), 452-457.
39. Wang, G., Yuan, Z., Zhang, P., Liu, Z., Wang, T., & Wei, L. 2020. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in maize under drought stress and rewatering. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(4), 705-717.

40. Wang, L., Xiang, L., Hong, J., Xie, Z., & Li, B. 2019. Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). *3 Biotech*, 9(6), 1-12.
41. Williams, C. R., Baccarella, A., Parrish, J. Z., & Kim, C. C. 2016. Trimming of sequence reads alters RNA-Seq gene expression estimates. *BMC bioinformatics*, 17(1), 1-13.
42. Xu, K., Chen, S., Li, T., Ma, X., Liang, X., Ding, X., ... & Luo, L. 2015. OsGRAS23, a rice GRAS transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes. *BMC plant biology*, 15(1), 1-13.
43. Xu, P., Guo, Q., Pang, X., Zhang, P., Kong, D., & Liu, J. 2020. New Insights into Evolution of Plant Heat Shock Factors (Hsfs) and Expression Analysis of Tea Genes in Response to Abiotic Stresses. *Plants*, 9(3), 311.
44. Xu, W., Zhang, N., Jiao, Y., Li, R., Xiao, D., & Wang, Z. 2014. The grapevine basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor positively modulates CBF-pathway and confers tolerance to cold-stress in *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports*, 41(8), 5329-5342.
45. Yuan, Y., Fang, L., Karungo, S. K., Zhang, L., Gao, Y., Li, S., & Xin, H. 2016. Overexpression of VaPAT1, a GRAS transcription factor from *Vitis amurens*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 35(3), 655-666.
46. Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., & Ma, Y. 2009. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of experimental botany*, 60(13), 3781-3796.
47. Zhang, Y., Yu, H., Yang, X., Li, Q., Ling, J., Wang, H., ... & Jiang, W. 2016. CsWRKY46, a WRKY transcription factor from cucumber, confers cold resistance in transgenic-plant by regulating a set of cold-stress responsive genes in an ABA-dependent manner. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 478-487.
48. Zhuo, X., Zheng, T., Zhang, Z., Zhang, Y., Jiang, L., Ahmad, S., ... & Zhang, Q. 2018. Genome-wide analysis of the NAC transcription factor gene family reveals differential expression patterns and cold-stress responses in the woody plant *Prunus mume*. *Genes*, 9(10), 494.

IX APENDICE

Apéndice 1. Reglas para asignar la familia de factor de transcripción. Familia: familia de FT que se asignará; Dominio de unión a ADN: dominio proteico de reconocimiento de ADN característico de cada familia o superfamilia de FT; Dominio auxiliar: Dominio utilizado para asignar la subfamilia en caso de ser necesario; Dominio no admitido como FT: dominio característico de proteínas sin actividad en la transcripción.

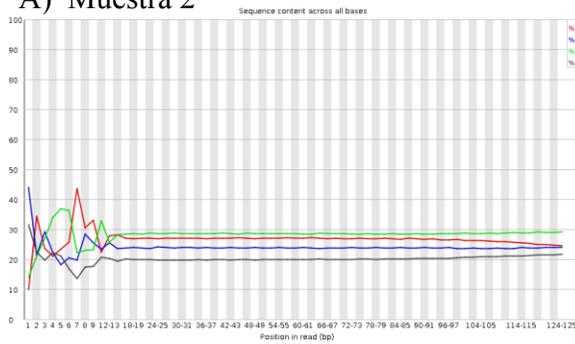
Familia	Dominio de unión a ADN	Dominio auxiliar	Dominio no admitido como FT
AP2	AP2 (≥ 2) (PF00847)		
AP2/ERF	ERF AP2 (1) (PF00847)		
	RAV AP2 (PF00847) B3 (PF02362)		
B3 superfamily	ARF B3 (PF02362)	Auxin_resp (PF06507)	
BBR-BPC	B3 GAGA_bind (PF06217)		
BES1	DUF822 (PF05687)		
bHLH	HLH (PF00010)		
bZIP	bZIP_1 (PF00170)		
C2C2	CO-like zf-B_box (PF00643)	CCT (PF06203)	
	Dof Zf-Dof (PF02701)		

	GATA	GATA-zf (PF00320)	
	LSD	Zf-LSD1 (PF06943)	Peptidase_C14 (PF00656)
	YABBY	YABBY (PF04690)	
C2H2		zf-C2H2 (PF00096)	RNase_T (PF00929)
C3H		Zf-CCCH (PF00642)	RRM_1 (PF00076) or Helicase_C (PF00271)
CAMTA		CG1 (PF03859)	
CPP		TCR (PF03638)	
DBB		zf-B_box (>=2) (PF00643)	
E2F/DP		E2F_TDP (PF02319)	
EIL		EIN3 (PF04873)	
FAR1		FAR1 (PF03101)	
GARP	ARR-B	G2-like (self-Response_reg build) (PF00072)	
	G2-like	G2-like (self- build)	
GeBP		DUF573 (PF04504)	
GRAS		GRAS (PF03514)	
GRF		WRC (PF08879) QLQ (PF08880)	

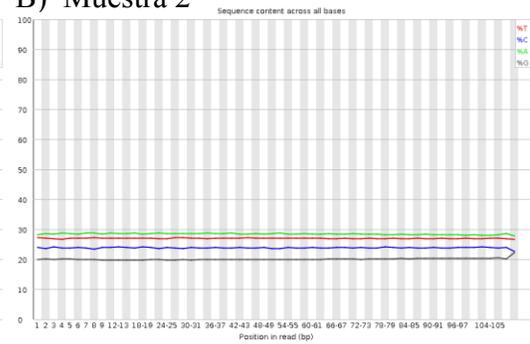
	HD-ZIP	Homeobox (PF00046)	HD-ZIP_I/II (self- build) or SMART (PF01852)	
	TALE	Homeobox (PF00046)	BELL (self-build) or ELK (PF03789)	
HB	WOX	homeobox (PF00046)	Wus type homeobox (self-build)	
	HB-PHD	homeobox (PF00046)	PHD (PF00628)	
	HB-other	homeobox (PF00046)		
HRT-like		HRT-like	(self- build)	
HSF		HSF_dna_bind (PF00447)		
LBD (AS2/LOB)		DUF260 (PF03195)		
LFY		FLO_LFY (PF01698)		
	M_type	SRF-TF (PF00319)		
MADS	MIKC	SRF-TF (PF00319)	K-box (PF01486)	
MYB	MYB	Myb_dna_bind (≥ 2) (PF00249)		SWIRM (PF04433)
superfamily	MYB_related	Myb_dna_bind (1) (PF00249)		SWIRM (PF04433)
NAC		NAM (PF02365)		

NF-X1		Zf-NF-X1 (PF01422)
	NF-YA	CBFB_NFYA (PF02045)
NF-Y	NF-YB	NF-YB (self- build)
	NF-YC	NF-YC (self- build)
Nin-like		RWP-RK (PF02042)
NZZ/SPL		NOZZLE (PF08744)
S1Fa-like		S1FA (PF04689)
SAP		SAP (self-build)
SBP		SBP (PF03110)
SRS		DUF702 (PF05142)
STAT		STAT (self-build)
TCP		TCP (PF03634)
Trihelix		Trihelix (self- build)
VOZ		VOZ (self-build)
Whirly		Whirly (PF08536)
WRKY		WRKY (PF03106)
ZF-HD		ZF-HD_dimer (PF04770)

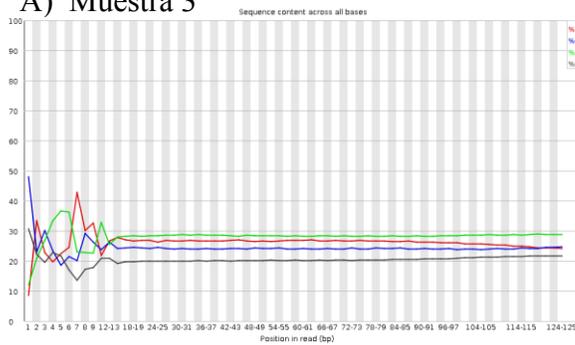
A) Muestra 2



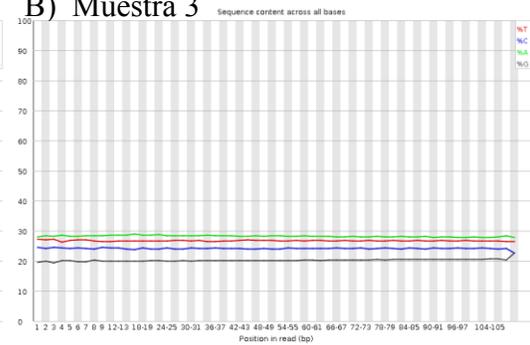
B) Muestra 2



A) Muestra 3

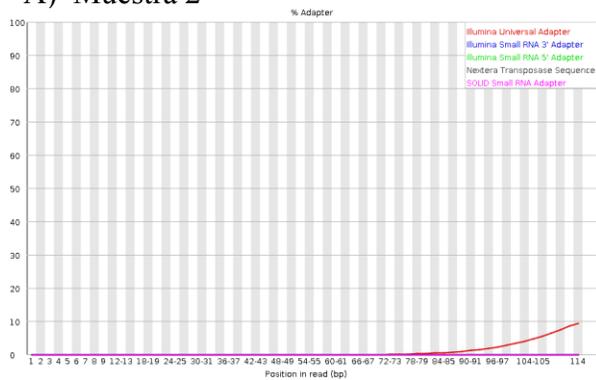


B) Muestra 3

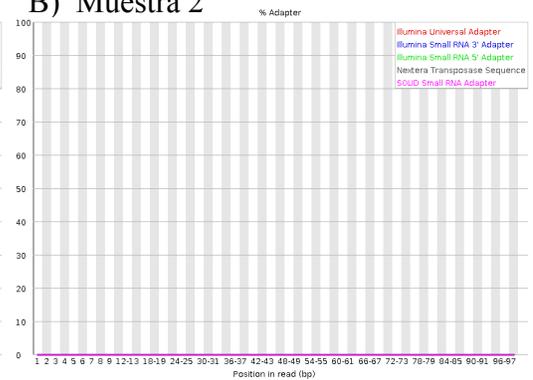


Apéndice 2. A) Proporción de base por posición en las secuencias antes de procesar B) Proporción de base por posición en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Eje horizontal es la posición en la lectura, mientras que el eje vertical muestra el porcentaje. Guanina gris, citosina azul, timina rojo, adenina verde. Muestra 2 y 3 del tratamiento AAH.

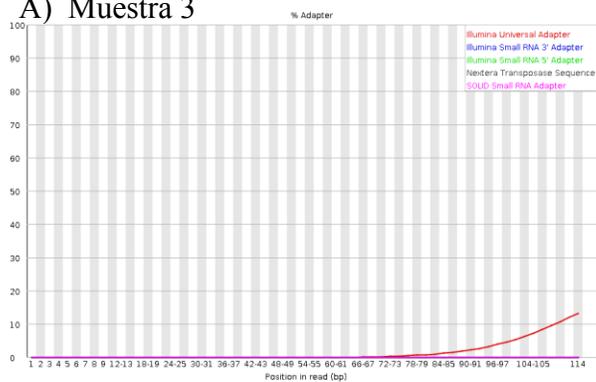
A) Muestra 2



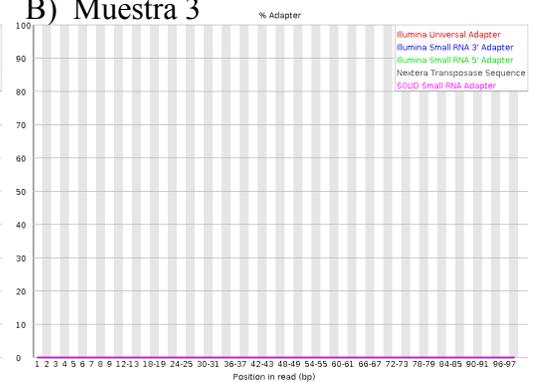
B) Muestra 2



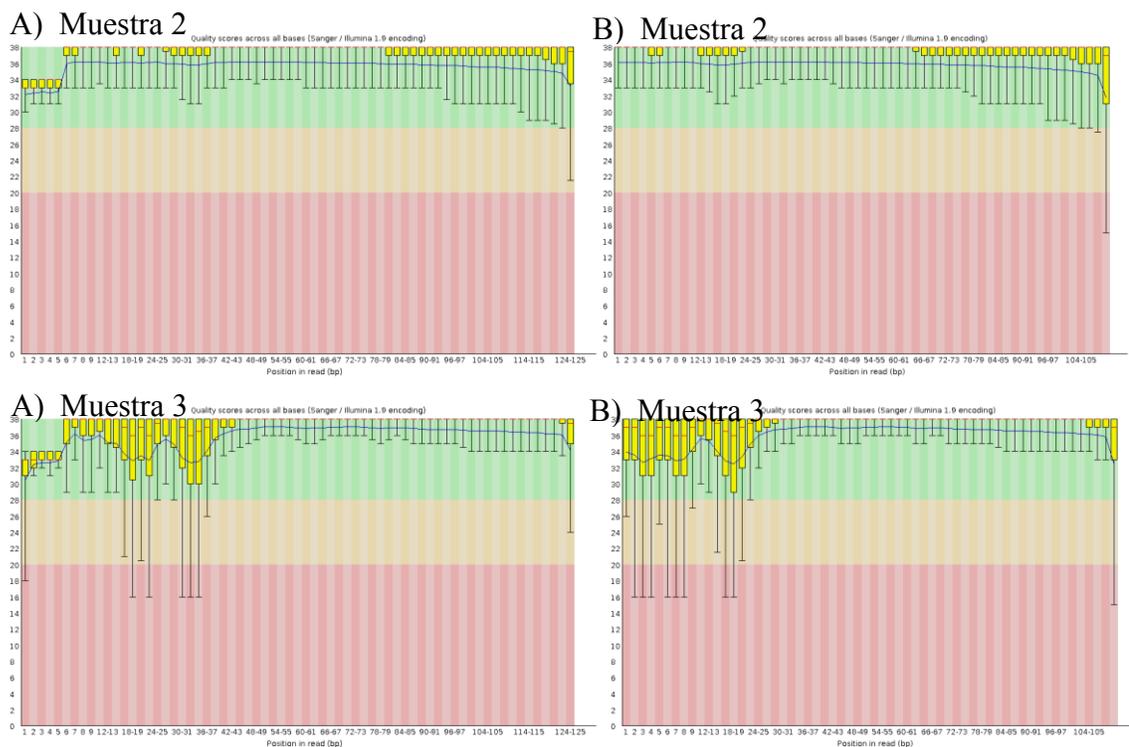
A) Muestra 3



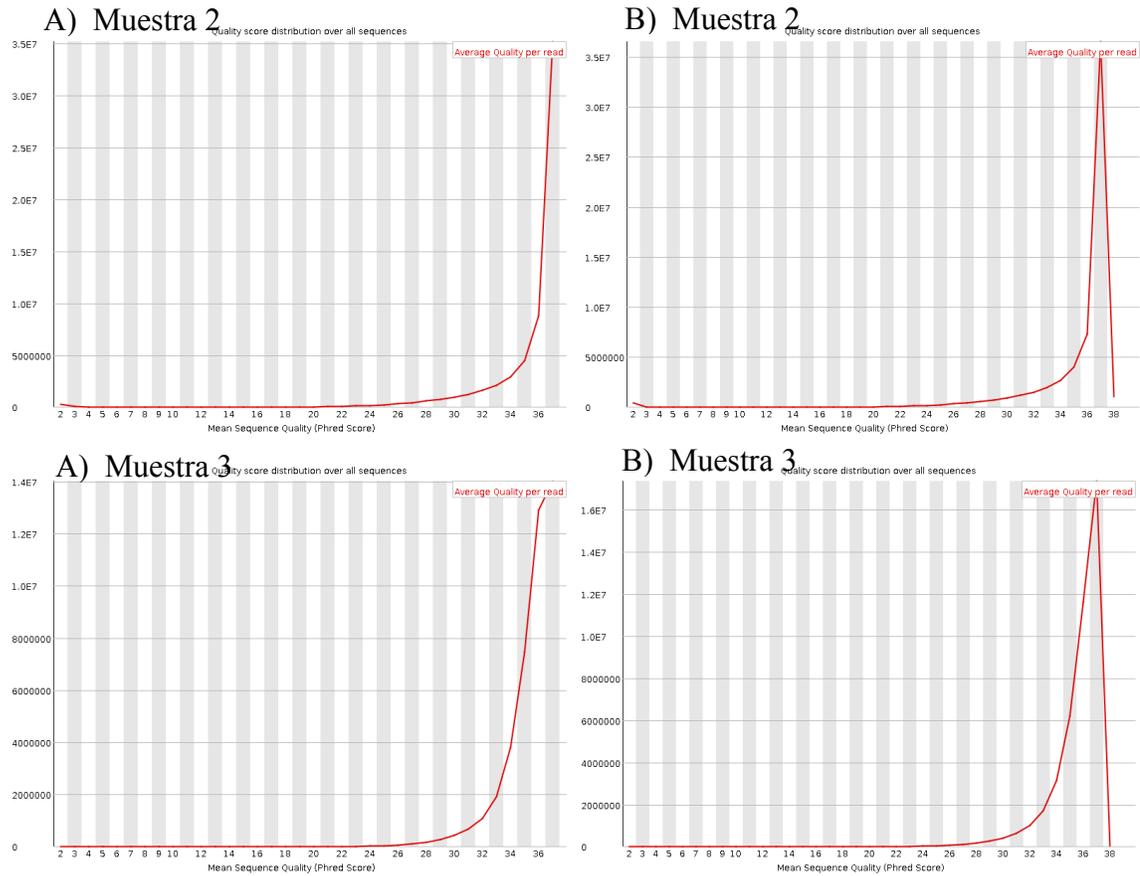
B) Muestra 3



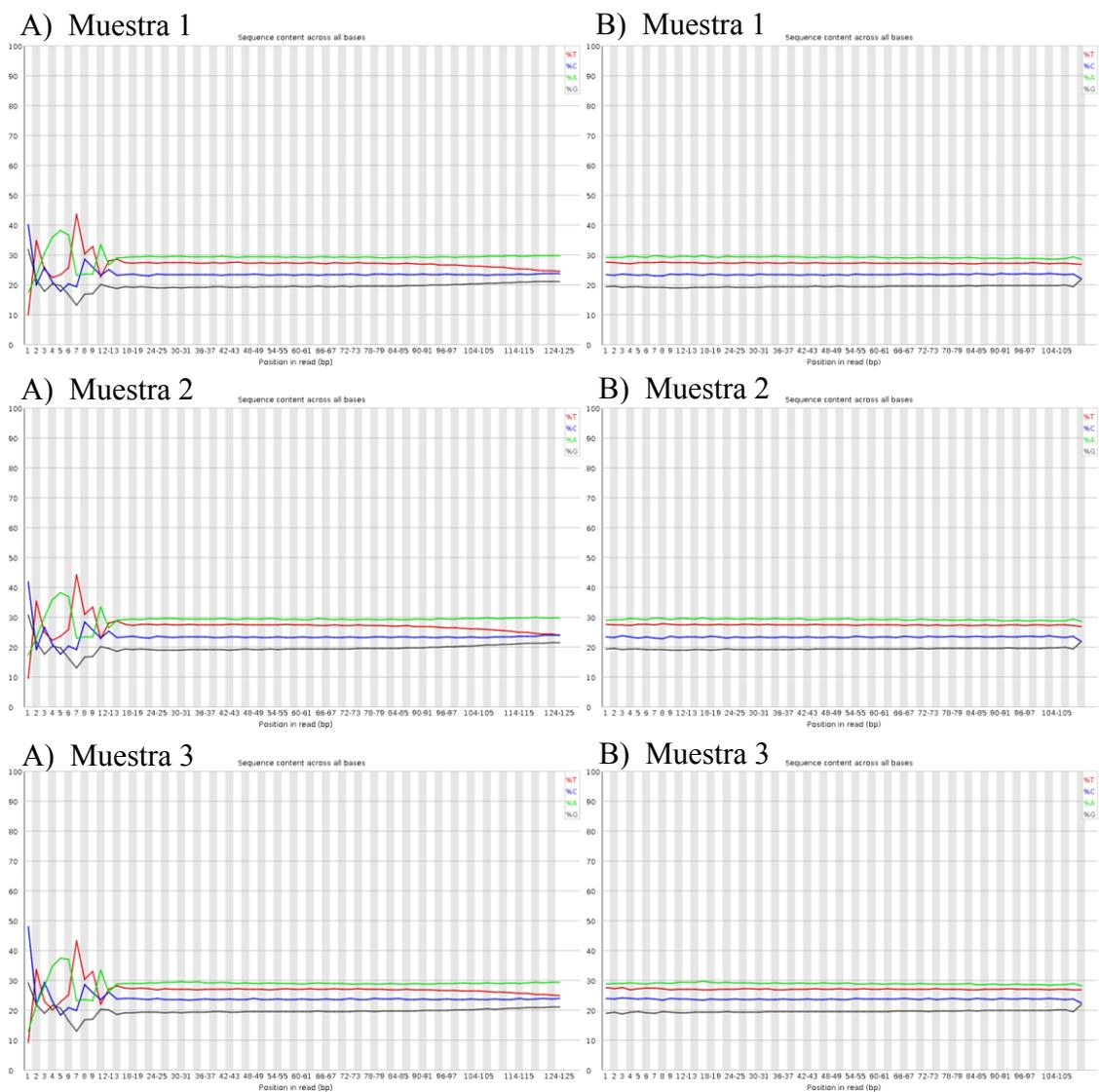
Apéndice 3. A) Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes de procesar. B) Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Muestra 2 y 3 del tratamiento AAH.



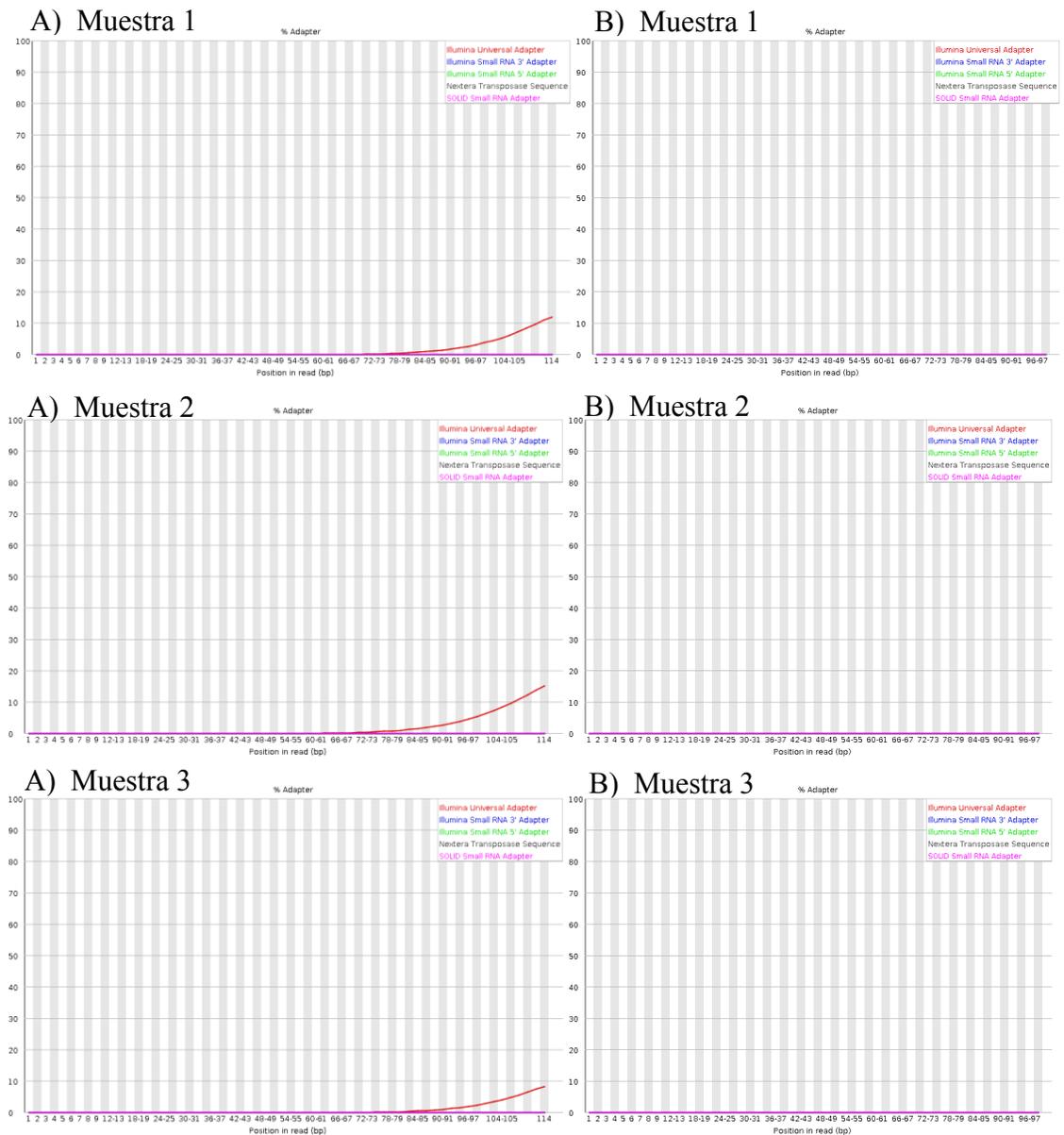
Apéndice 4. A) Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes de procesar. B) Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En amarillo los cuartiles; la línea roja es la media de calidad; línea azul la mediana. En el eje X, la cantidad de bases de las lecturas, El eje Y, se representan las calidades 0-38: Zona verde: 28-38. Corresponden a una muy buena calidad; Zona naranja: zona de calidad intermedia (20-28). Muestra 2 y 3 del tratamiento AAH.



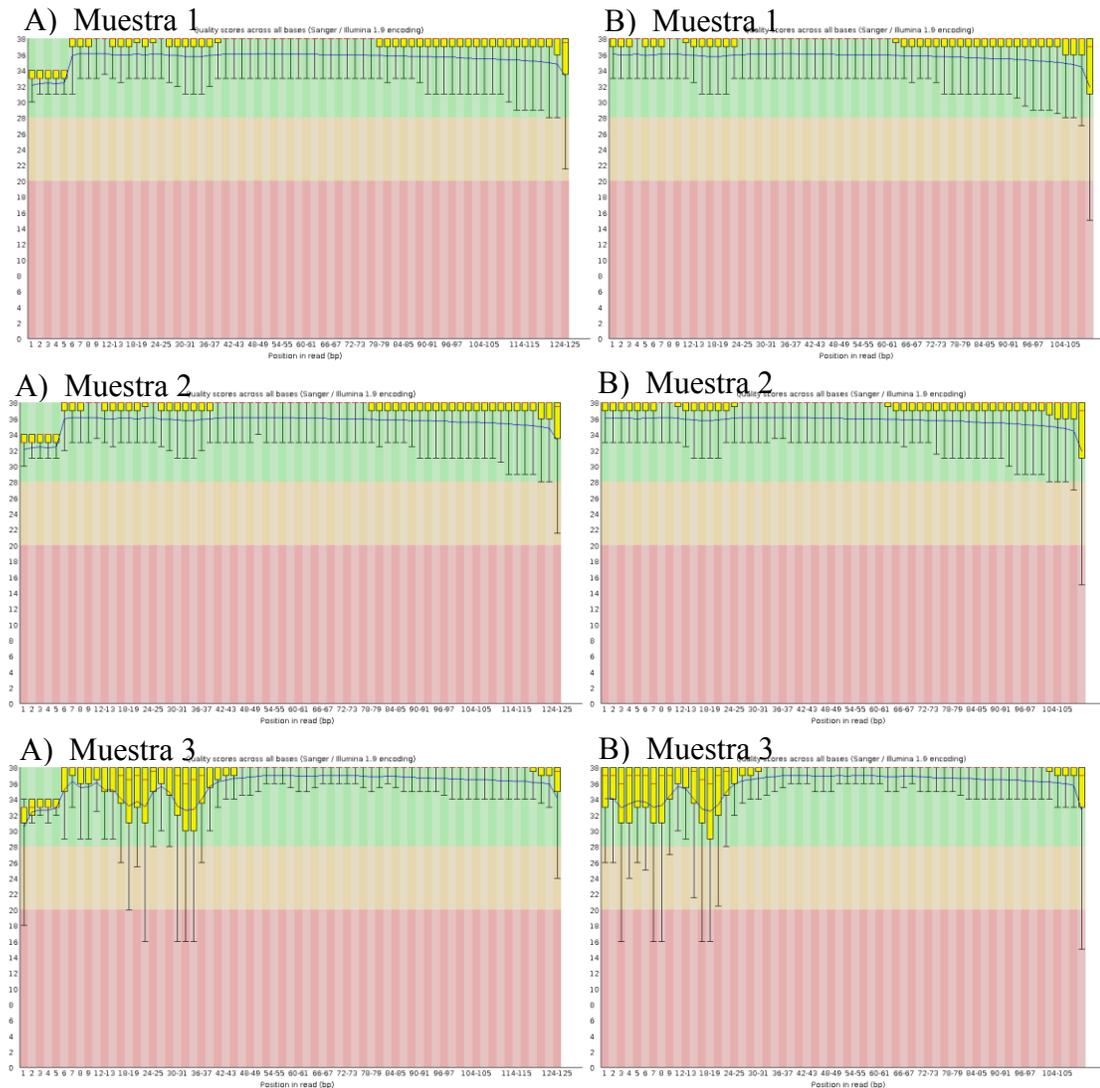
Apéndice 5. Puntaje de calidad por secuencia antes de procesar. Puntaje de calidad por secuencia después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En el eje vertical se muestra el número de lecturas en la biblioteca. El eje horizontal la calidad promedio de la secuencia (Puntaje Phred). Muestra 2 y 3 del tratamiento AAH.



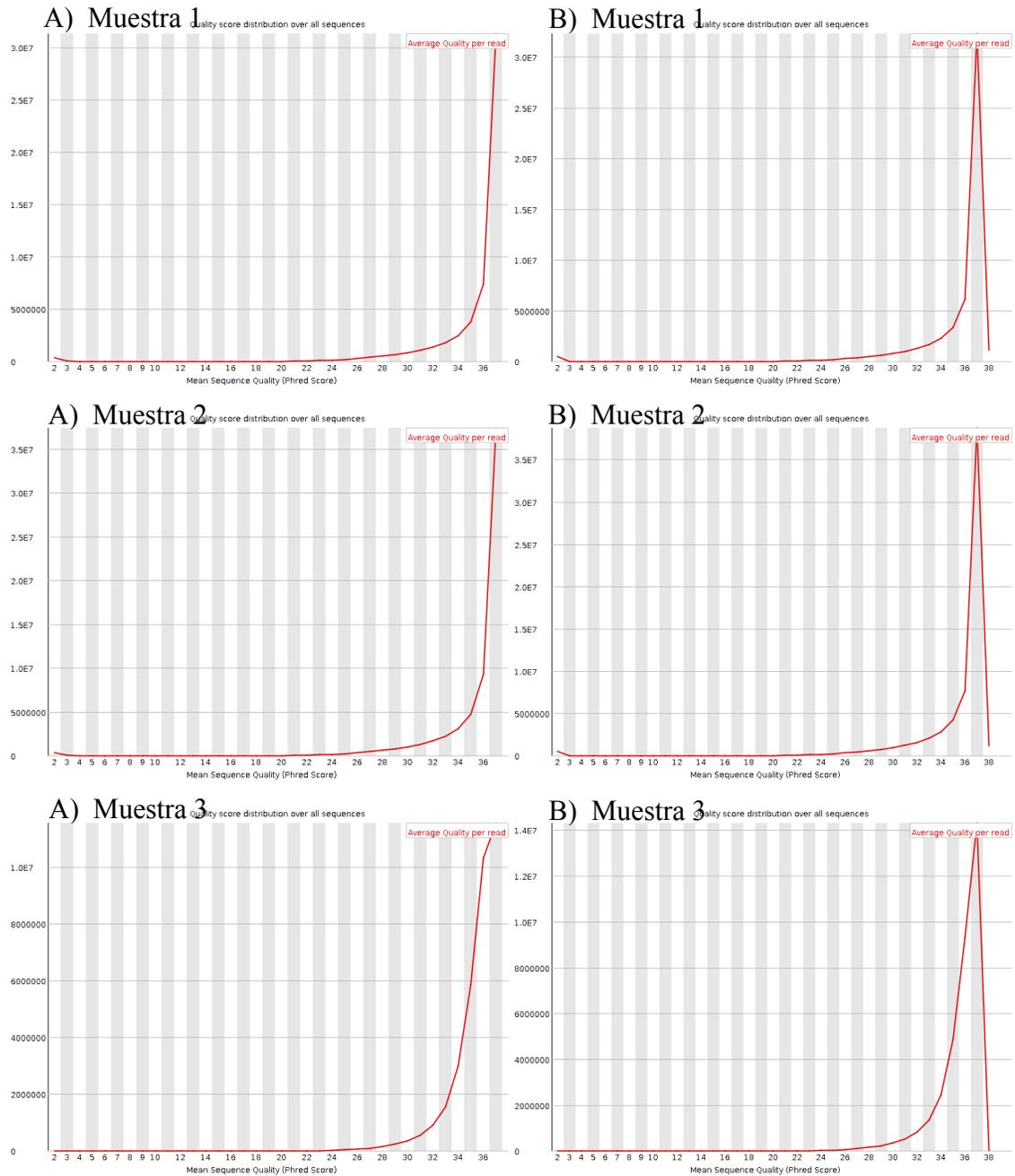
Apéndice 6. A) Proporción de base por posición en las secuencias antes de procesar B) Proporción de base por posición en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Eje horizontal es la posición en la lectura, mientras que el eje vertical muestra el porcentaje. Guanina gris, citosina azul, timina rojo, adenina verde. Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento ADH.



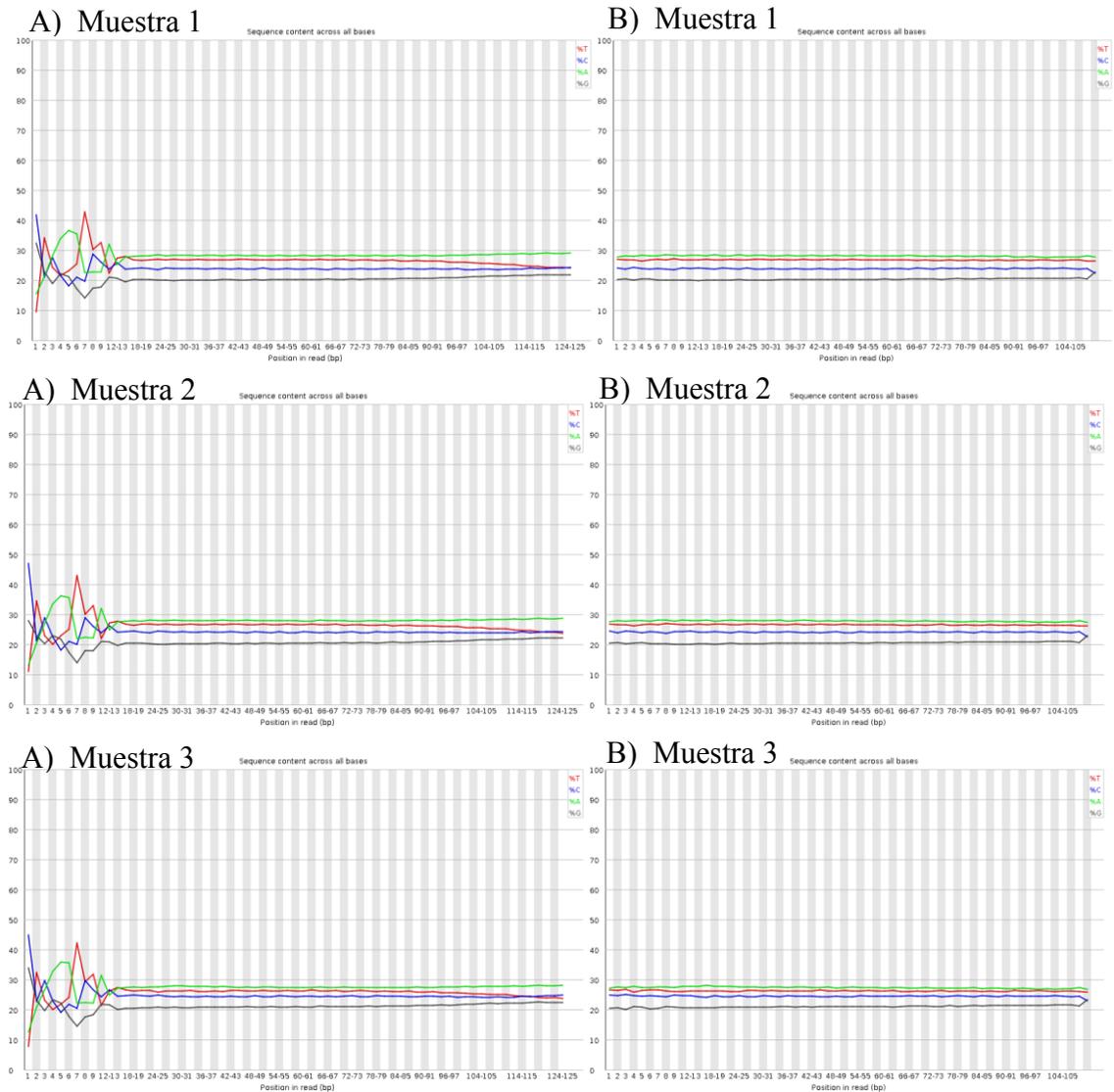
Apéndice 7. A) Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes de procesar. B) Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento ADH.



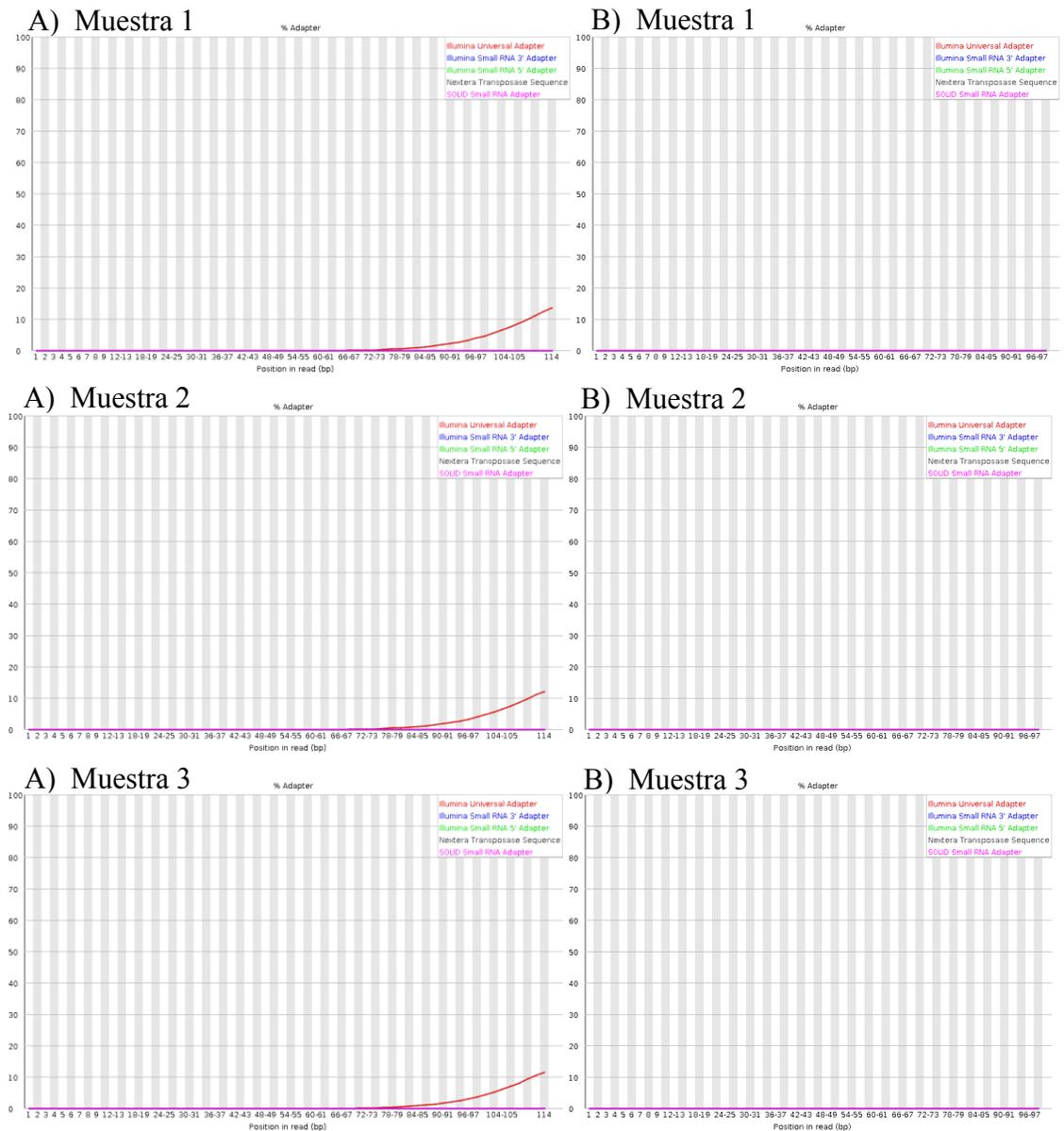
Apéndice 8. A) Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes de procesar. B) Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En amarillo los cuartiles; la línea roja es la media de calidad; línea azul la mediana. En el eje X, la cantidad de bases de las lecturas, El eje Y, se representan las calidades 0-38: Zona verde: 28-38. Corresponden a una muy buena calidad; Zona naranja: zona de calidad intermedia (20-28). Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento ADH.



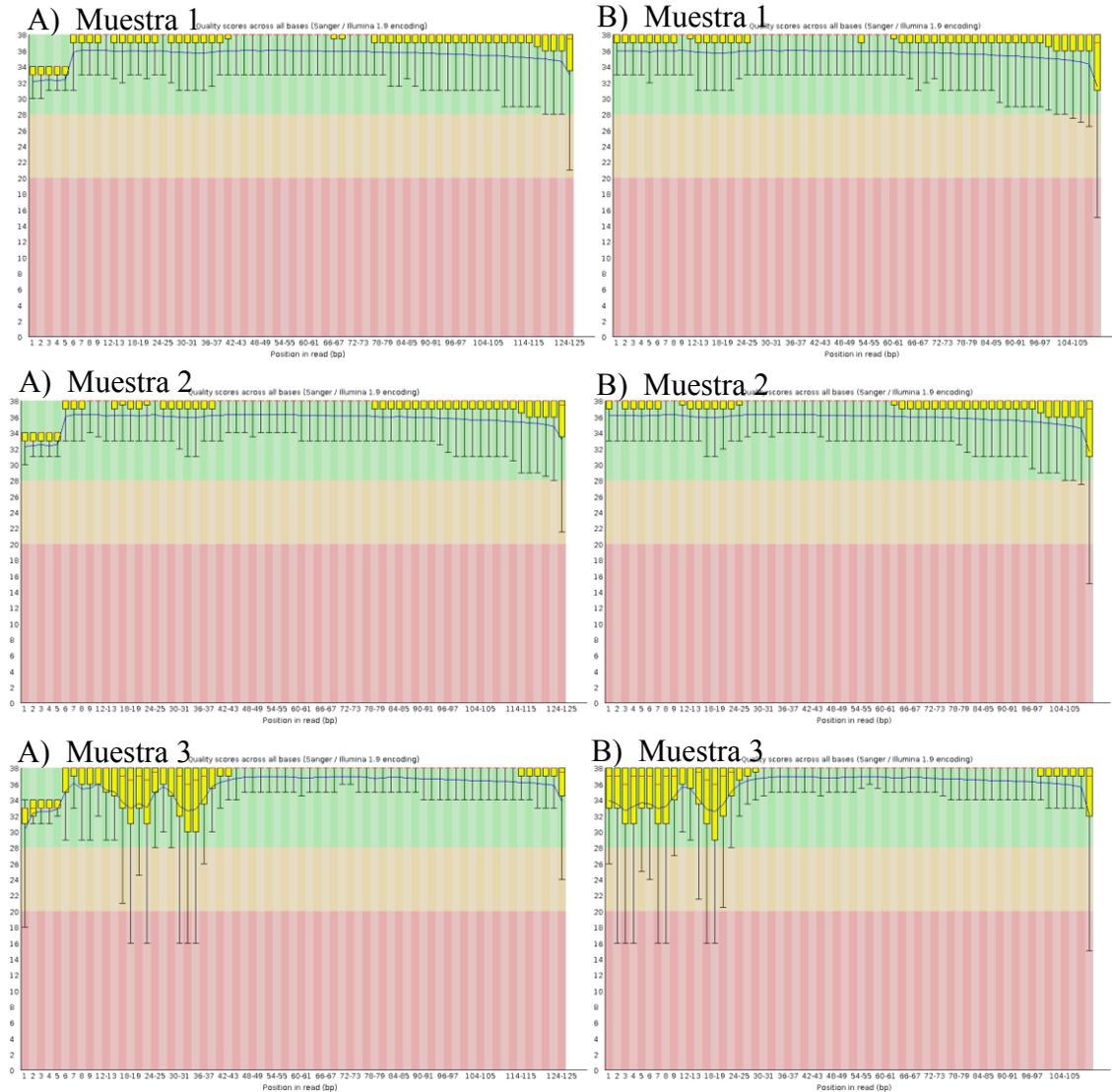
Apéndice 9. Puntaje de calidad por secuencia antes de procesar. Puntaje de calidad por secuencia después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En el eje vertical se muestra el número de lecturas en la biblioteca. El eje horizontal la calidad promedio de la secuencia (Puntaje Phred). Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento ADH.



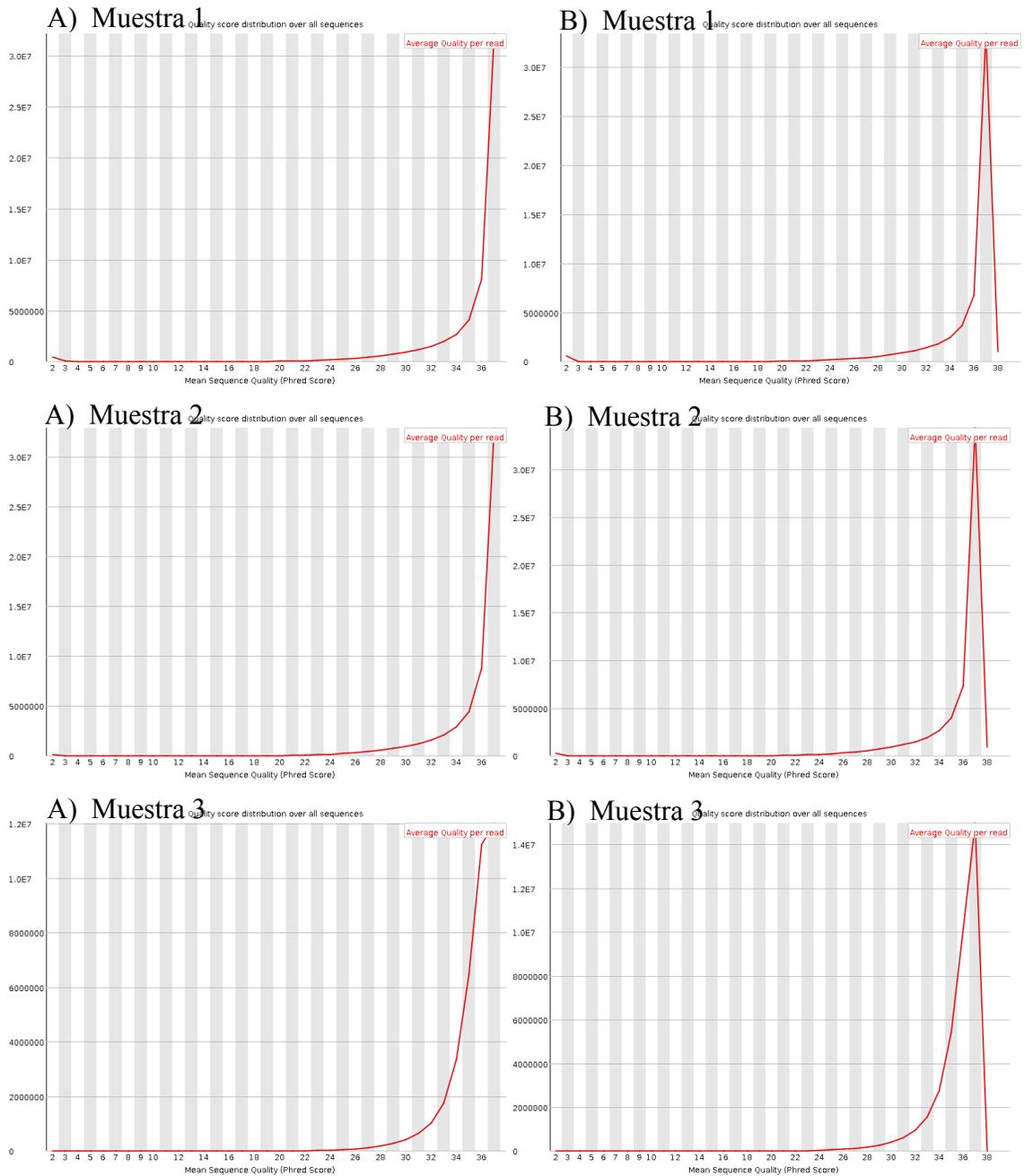
Apéndice 10. A) Proporción de base por posición en las secuencias antes de procesar B) Proporción de base por posición en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Eje horizontal es la posición en la lectura, mientras que el eje vertical muestra el porcentaje. Guanina gris, citosina azul, timina rojo, adenina verde. Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento NA.



Apéndice 11. A) Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca antes de procesar. B) Porcentaje de adaptadores a lo largo y posición de las lecturas de la biblioteca después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento NA.



Apéndice 12. A) Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias antes de procesar. B) Reporte de análisis de calidad por cada base en las secuencias después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En amarillo los cuartiles; la línea roja es la media de calidad; línea azul la mediana. En el eje X, la cantidad de bases de las lecturas, El eje Y, se representan las calidades 0-38: Zona verde: 28-38. Corresponden a una muy buena calidad; Zona naranja: zona de calidad intermedia (20-28). Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento NA.



Apéndice 13. Puntaje de calidad por secuencia antes de procesar. Puntaje de calidad por secuencia después del recorte de nucleótidos del extremo 5'. En el eje vertical se muestra el número de lecturas en la biblioteca. El eje horizontal la calidad promedio de la secuencia (Puntaje Phred). Muestra 1, 2 y 3 del tratamiento NA.

Apéndice 14. Tabla comparativa entre Número de FT representados en *E. nitens* x *E. globulus*, por especie alineados con la base de datos PLANTTFDB y secuencias de péptidos y aminoácidos de *E. grandis*, con hit positivo y anotados.

Familia de FT	N° de FT identificados	N° de unigenes de FT anotados
bHLH	175	107
WRKY	119	74
MYB_related	73	70
MYB	83	69
NAC	92	66
GRAS	53	41
ERF	50	37
G2-like	54	36
B3	36	30
FAR1	36	22
bZIP	25	20
HB-Other	32	19
Trihelix	25	19
C3H	23	17
HSF	19	17
Dof	17	15
SBP	18	14
AP2	20	13
ARF	17	13
HD-ZIP	18	12
M-type_MADS	16	12
GATA	16	11
MIKC_MADS	13	11
NF-YA	17	9
TCP	12	9
DREB	13	8
LBD	8	8
NF-YC	11	7
Nin-like	10	7
GeBP	8	6
BES1	8	6

CAMTA	9	5
CPP	7	4
GRF	7	4
BBR-BPC	6	4
NF-YB	5	4
C2H2	7	3
DBB	4	3
ARR-B	3	3
EIL	4	2
LSD	3	2
E2F/DP	3	2
YABBY	3	2
SRS	3	2
Whirly	2	2
CO-Like	1	1
ZF-HD	1	1
NF-X1	1	1
HB-PHD	1	1
CBF	1	1
HRT-like	1	1
VOZ	1	1
STAT	1	1
TOTAL	1191	855

Apéndice 15. Número total de factores de transcripción (FT) del híbrido *E. nitens x E. globulus* expresados por familia y condición NA (No aclimatado), AAH (Aclimatado antes de helada), ADH (Aclimatado después de helada).

Familia de FT	FT expresados en condición NA	FT expresados en condición AAH	FT expresados en condición ADH
bHLH	105	104	105
WRKY	74	72	72
MYB_related	68	69	69
MYB	67	67	65
NAC	66	66	66
GRAS	41	40	41

ERF	37	37	36
G2-like	36	36	36
B3	29	29	27
FAR1	22	22	22
bZIP	20	20	20
HB-Other	19	19	19
Trihelix	19	19	19
C3H	17	17	17
HSF	17	17	17
Dof	15	15	15
SBP	14	14	14
ARF	13	13	13
AP2	12	12	13
HD-ZIP	12	12	12
GATA	11	11	11
MIKC_MADS	11	11	11
M-type_MADS	10	12	11
NF-YA	9	9	8
TCP	9	9	9
DREB	8	8	7
LBD	8	6	6
NF-YC	7	7	7
Nin-like	7	7	7
BES1	6	6	6
GeBP	6	6	6
CAMTA	5	5	5
BBR-BPC	4	4	4
CPP	4	3	3
GRF	4	4	4
NF-YB	4	4	4
ARR-B	3	3	3
DBB	3	3	3
C2H2	2	3	3
E2F/DP	2	2	2
EIL	2	2	2
LSD	2	2	2
SRS	2	2	2
Whirly	2	2	2

YABBY	2	2	2
CBF	1	1	1
CO-Like	1	1	1
HB-PHD	1	1	1
HRT-like	1	1	1
NF-X1	1	1	1
STAT	1	1	1
VOZ	1	1	1
ZF-HD	1	1	1
TOTAL	844	841	836

Apéndice 16. Valores de expresión Log₂FC obtenidos mediante el análisis por DESeq2 con ajuste de p-value (padj) de 0,005, en las condiciones NA vs AAH.

N°	FT regulados negativamente			FT regulados positivamente		
	ID	Log ₂ F _C	padj	ID	Log ₂ F _C	padj
1	EnigloWRKY 69	-4,70	7,85E-12	EnigloM-type MADS 10	8,86	8,64E-11
2	EnigloERF 12	-4,41	1,48E-05	EnigloERF 27	3,12	1,33E-08
3	EnigloWRKY 29	-4,02	3,79E-10	EnigloMYB 37	2,95	1,68E-03
4	EnigloMYB 33	-3,83	6,22E-05	EnigloERF 18	2,79	6,26E-05
5	EnigloMYB related 10	-3,50	6,50E-06	EnigloM-type MADS 3	2,73	8,57E-35
6	EniglobHLH 94	-3,18	5,75E-03	EnigloMYB 6	2,53	7,58E-05
7	EnigloWRKY 52	-3,06	1,68E-08	EnigloHSF 3	2,52	2,03E-10
8	EniglobHLH 61	-2,80	2,69E-05	EnigloNAC 50	2,37	1,95E-06
9	EnigloMYB 47	-2,71	3,51E-02	EnigloDof 2	2,26	5,52E-12
10	EnigloDof 9	-2,68	4,64E-04	EniglobHLH 59	2,15	5,57E-12
11	EnigloWRKY 47	-2,32	1,32E-06	EnigloNAC 53	2,14	4,50E-03
12	EniglobHLH 46	-2,27	1,27E-02	EnigloMYB related 50	2,08	4,81E-02

13	EnigloMYB related 37	-2,23	1,90E- 05	EnigloHSF 9	2,04	5,22E- 05
14	EnigloWRKY 36	-2,19	1,39E- 06	EnigloMYB related 66	1,98	4,15E- 12
15	EniglobHLH 52	-2,18	7,64E- 10	EniglobHLH 38	1,94	6,55E- 11
16	EnigloTCP 9	-2,03	7,88E- 05	EnigloMYB 39	1,93	7,87E- 21
17	EnigloMYB 65	-1,99	1,66E- 02	EnigloDBB 3	1,83	7,95E- 19
18	EnigloMYB related 38	-1,91	7,16E- 03	EnigloNAC 25	1,82	7,19E- 03
19	EniglobHLH 76	-1,84	1,12E- 07	EnigloG2-like 3	1,79	3,67E- 26
20	EnigloNAC 38	-1,81	6,94E- 26	EnigloMYB related 12	1,78	1,79E- 14
21	EnigloWRKY 67	-1,79	3,27E- 03	EnigloERF 7	1,73	2,63E- 03
22	EniglobHLH 65	-1,79	4,50E- 05	EnigloHB-Other 8	1,72	9,77E- 09
23	EnigloDREB 1	-1,77	4,89E- 02	EnigloNAC 29	1,69	3,45E- 03
24	EnigloWRKY 66	-1,75	2,94E- 07	EnigloERF 4	1,65	2,82E- 02
25	EnigloNAC 23	-1,75	2,54E- 04	EnigloHD-ZIP 8	1,64	2,90E- 30
26	EniglobHLH 48	-1,75	6,05E- 03	EnigloM-type MADS 4	1,63	5,79E- 05
27	EniglobB3 4	-1,74	5,57E- 05	EnigloGRAS 10	1,58	3,79E- 05
28	EnigloWRKY 2	-1,74	4,99E- 08	EnigloMYB 16	1,52	2,08E- 07
29	EnigloHSF 5	-1,70	6,73E- 03	EnigloMYB 29	1,51	1,14E- 03
30	EnigloMYB 3	-1,69	7,20E- 04	EnigloDof 11	1,47	9,07E- 08
31	EnigloNAC 16	-1,65	3,80E- 02	EnigloNAC 54	1,44	4,86E- 02
32	EnigloGRAS 29	-1,59	1,06E- 07	EniglobHLH 27	1,44	4,56E- 10
33	EnigloMYB related 61	-1,58	1,59E- 05	EnigloWhirly 1	1,33	1,99E- 18
34	EnigloWRKY 72	-1,57	3,98E- 03	EnigloWRKY 16	1,31	4,35E- 30

35	EnigloC3H 14	-1,55	7,07E-07	EnigloC3H 5	1,30	1,26E-04
36	EnigloNAC 37	-1,53	1,60E-04	EnigloE2F/DP 1	1,25	1,81E-05
37	EnigloLBD 6	-1,52	1,10E-02	EniglobHLH 93	1,24	6,59E-20
38	EnigloZF-HD 1	-1,51	4,76E-03	EniglobHLH 7	1,23	1,27E-05
39	EnigloDREB 7	-1,50	9,52E-03	EnigloHB-Other 17	1,22	9,02E-10
40	EnigloWRKY 59	-1,49	8,77E-03	EnigloERF 19	1,21	3,26E-02
41	EnigloMYB related 51	-1,48	6,23E-03	EniglobHLH 78	1,20	1,53E-03
42	EnigloMYB related 68	-1,46	2,22E-11	EnigloNF-YB 1	1,18	7,52E-17
43	EnigloDof 3	-1,44	6,42E-07	EnigloG2-like 18	1,18	1,11E-06
44	EnigloNAC 35	-1,44	1,85E-04	EnigloM-type MADS 8	1,17	1,26E-16
45	EnigloERF 34	-1,41	1,96E-06	EnigloTrihelix 8	1,16	3,67E-12
46	EnigloB3 29	-1,38	3,51E-03	EnigloTCP 7	1,16	7,32E-06
47	EniglobHLH 36	-1,37	2,20E-03	EnigloWRKY 20	1,15	3,89E-07
48	EnigloG2-like 21	-1,37	2,52E-02	EnigloMYB 9	1,13	2,83E-10
49	EnigloERF 15	-1,37	5,91E-03	EniglobHLH 85	1,12	2,53E-05
50	EniglobHLH 53	-1,37	9,35E-03	EnigloERF 21	1,12	4,72E-05
51	EnigloGRAS 36	-1,35	4,15E-05	EnigloNAC 7	1,09	3,99E-03
52	EnigloWRKY 58	-1,35	4,71E-03	EnigloNAC 44	1,09	3,30E-02
53	EnigloNAC 11	-1,33	1,43E-05	EnigloB3 14	1,08	2,97E-10
54	EnigloERF 24	-1,31	8,38E-03	EnigloMYB 46	1,08	1,67E-02
55	EnigloHSF 8	-1,30	5,67E-03	EnigloNAC 45	1,06	1,54E-22
56	EnigloMYB 20	-1,27	1,83E-05	EnigloGRAS 34	1,05	8,83E-04

57	EnigloDof 10	-1,27	3,22E-14	EnigloWRKY 35	1,04	3,03E-02
58	EnigloNAC 47	-1,26	1,96E-02	EnigloCPP 3	1,02	5,10E-05
59	EniglobHLH 86	-1,24	4,60E-05	/	/	/
60	EniglobHLH 25	-1,24	1,85E-02	/	/	/
61	EnigloARR-B 3	-1,22	1,15E-02	/	/	/
62	EnigloNAC 36	-1,22	2,73E-13	/	/	/
63	EnigloFAR1 20	-1,17	1,40E-16	/	/	/
64	EniglobHLH 21	-1,15	3,39E-12	/	/	/
65	EnigloWRKY 30	-1,13	2,09E-02	/	/	/
66	EnigloMYB related 24	-1,10	4,91E-02	/	/	/
67	EnigloWRKY 6	-1,10	6,54E-04	/	/	/
68	EnigloDREB 2	-1,09	2,80E-05	/	/	/
69	EnigloGRAS 37	-1,09	3,75E-02	/	/	/
70	EnigloG2-like 35	-1,09	3,80E-05	/	/	/
71	EniglobHLH 95	-1,08	1,19E-02	/	/	/
72	EniglobHLH 68	-1,05	1,25E-03	/	/	/
73	EnigloMYB 50	-1,05	8,09E-04	/	/	/
74	EnigloGRAS 13	-1,04	2,42E-03	/	/	/
75	EnigloGRAS 12	-1,03	1,70E-03	/	/	/
76	EnigloNAC 42	-1,02	2,98E-08	/	/	/
77	EniglobZIP 2	-1,02	4,29E-02	/	/	/

Apéndice 17. Valores de expresión Log₂FC obtenidos mediante el análisis por DESeq2 con ajuste de p-value (padj) de 0,005, en las condiciones AAH vs ADH.

N°	FT regulados negativamente			FT regulados positivamente		
	ID	Log ₂ FC	padj	ID	Log ₂ FC	padj
1	EnigloNF-YC 5	-3,76	1,29E-03	EniglobHLH 3	7,64	1,13E-10
2	EnigloB3 29	-2,71	6,80E-07	EnigloWRKY 5	2,98	1,05E-15
3	EnigloARF 9	-2,67	2,41E-03	EnigloGRAS 30	2,22	9,01E-10
4	EnigloNF-YB 4	-2,57	2,94E-04	EniglobHLH 4	2,17	1,49E-15
5	EnigloB3 2	-2,39	2,82E-02	EnigloCAMTA 4	2,14	4,41E-26
6	EnigloERF 30	-2,17	1,89E-03	EnigloMYB 39	1,72	1,48E-14
7	EnigloMYB related 26	-2,14	3,48E-03	EnigloGRAS 29	1,42	2,59E-08
8	EnigloWRKY 59	-2,12	1,87E-03	EniglobHLH 12	1,04	2,81E-02
9	EnigloB3 26	-2,07	1,82E-02	EnigloNAC 37	1,00	3,80E-02
10	EnigloWRKY 58	-2,02	1,83E-03	/	/	/
11	EniglobHLH 68	-2,02	1,05E-03	/	/	/
12	EnigloDBB 2	-1,94	1,35E-02	/	/	/
13	EnigloWRKY 11	-1,89	3,28E-06	/	/	/
14	EnigloERF 14	-1,86	1,57E-07	/	/	/
15	EnigloHB-Other 7	-1,85	3,77E-05	/	/	/
16	EnigloGRAS 18	-1,83	4,46E-02	/	/	/
17	EnigloTrihelix 1	-1,80	2,53E-05	/	/	/
18	EniglobHLH 86	-1,75	1,67E-06	/	/	/
19	EnigloGeBP 3	-1,66	1,01E-02	/	/	/
20	EnigloDREB 4	-1,62	6,52E-08	/	/	/
21	EnigloHD-ZIP 6	-1,62	5,10E-06	/	/	/
22	EnigloC3H 7	-1,61	1,72E-02	/	/	/
23	EnigloTrihelix 12	-1,60	4,65E-04	/	/	/
24	EnigloB3 4	-1,56	1,98E-04	/	/	/
25	EnigloWRKY 39	-1,54	2,63E-03	/	/	/
26	EnigloAP2 7	-1,53	1,51E-03	/	/	/
27	EnigloWRKY 49	-1,49	2,65E-03	/	/	/
28	EniglobHLH 44	-1,39	5,49E-08	/	/	/
29	EniglobHLH 98	-1,37	2,40E-02	/	/	/
30	EniglobHLH 94	-1,36	1,28E-02	/	/	/
31	EnigloWRKY 2	-1,34	9,01E-12	/	/	/
32	EniglobHLH 93	-1,30	8,19E-18	/	/	/
33	EnigloHB-Other 5	-1,30	1,23E-04	/	/	/

34	EnigloMYB related 15	-1,30	4,16E-02	/	/	/
35	EniglobHLH 80	-1,29	2,60E-05	/	/	/
36	EnigloHB-Other 12	-1,28	1,10E-05	/	/	/
37	EnigloMYB related 29	-1,27	4,54E-02	/	/	/
38	EnigloMYB related 20	-1,25	1,01E-04	/	/	/
39	EnigloGeBP 1	-1,22	2,14E-02	/	/	/
40	EnigloHB-Other 11	-1,21	8,29E-03	/	/	/
41	EnigloHB-Other 19	-1,20	1,01E-02	/	/	/
42	EnigloMYB 21	-1,20	1,95E-05	/	/	/
43	EnigloERF 27	-1,19	3,87E-02	/	/	/
44	EnigloERF 36	-1,19	5,54E-03	/	/	/
45	EnigloTCP 7	-1,18	1,85E-06	/	/	/
46	EnigloHB-Other 4	-1,17	3,57E-07	/	/	/
47	EnigloNAC 19	-1,17	8,73E-08	/	/	/
48	EnigloWRKY 54	-1,16	1,05E-03	/	/	/
49	EnigloTrihelix 6	-1,15	1,56E-02	/	/	/
50	EniglobZIP 16	-1,13	4,69E-05	/	/	/
51	EnigloERF 19	-1,11	3,70E-02	/	/	/
52	EnigloMYB 60	-1,11	4,17E-03	/	/	/
53	EnigloNAC 51	-1,09	4,64E-02	/	/	/
54	EnigloWRKY 7	-1,09	2,19E-02	/	/	/
55	EnigloTrihelix 3	-1,09	7,80E-04	/	/	/
56	EnigloWRKY 40	-1,09	4,26E-03	/	/	/
57	EnigloFAR1 18	-1,08	2,65E-03	/	/	/
58	EniglobHLH 63	-1,08	2,63E-02	/	/	/
59	EnigloWRKY 73	-1,07	3,20E-02	/	/	/
60	EnigloAP2 10	-1,07	1,69E-06	/	/	/
61	EniglobHLH 82	-1,06	9,70E-03	/	/	/
62	EnigloTrihelix 4	-1,06	9,31E-03	/	/	/
63	EniglobHLH 92	-1,05	1,14E-07	/	/	/
64	EniglobHLH 50	-1,04	4,06E-03	/	/	/
65	EnigloWRKY 34	-1,04	4,62E-02	/	/	/
66	EnigloMYB related 12	-1,03	1,99E-06	/	/	/
67	EnigloNAC 49	-1,02	8,58E-16	/	/	/

Apéndice 18. Valores de expresión Log₂FC obtenidos mediante el análisis por DESeq2 con ajuste de p-value (padj) de 0,005, en las condiciones NA vs ADH.

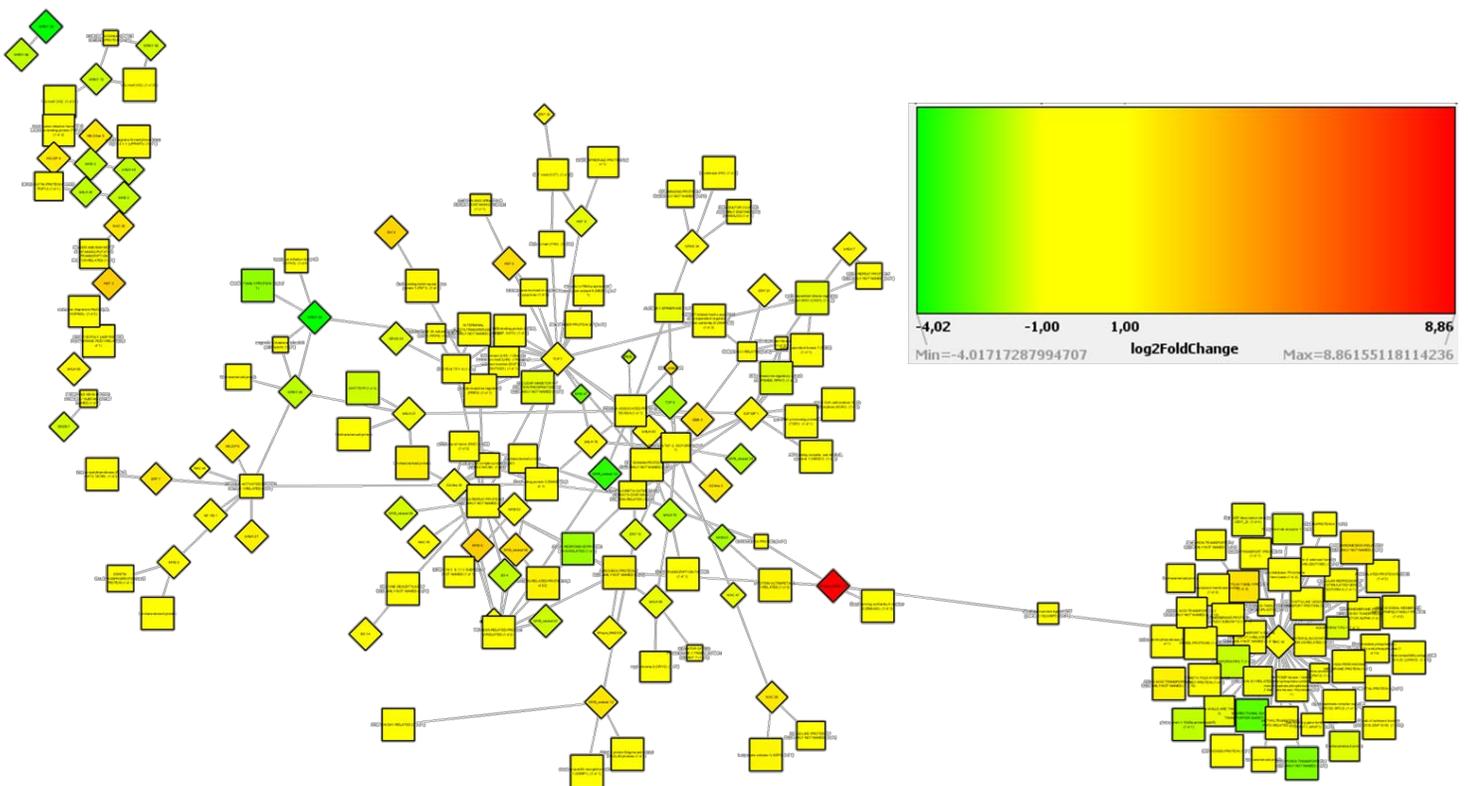
N°	FT regulados negativamente			FT regulados positivamente		
	ID	Log ₂ FC	padj	ID	Log ₂ FC	Padj
1	EnigloLBD 6	-5,65	7,82E-12	EniglobHLH 3	8,41	8,55E-11
2	EnigloMYB 33	-5,04	3,12E-11	EnigloM-type MADS 10	8,37	6,07E-10
3	EnigloWRKY 69	-4,99	1,49E-19	EnigloWRKY 5	3,96	3,65E-32
4	EnigloWRKY 29	-4,82	4,17E-15	EnigloMYB 39	3,65	4,06E-68
5	EniglobHLH 94	-4,55	3,11E-05	EnigloMYB 37	3,48	3,82E-05
6	EnigloMYB 47	-4,33	5,87E-19	EnigloHSF 3	3,34	2,91E-33
7	EnigloB3 29	-4,10	2,13E-13	EnigloMYB 6	3,22	2,21E-08
8	EnigloMYB 3	-4,07	2,09E-20	EnigloMYB related 35	3,02	6,86E-04
9	EnigloWRKY 52	-4,02	1,77E-23	EnigloGRAS 10	2,59	2,91E-13
10	EnigloMYB related 10	-3,84	1,75E-09	EniglobHLH 4	2,58	2,29E-09
11	EnigloWRKY 59	-3,61	5,00E-33	EnigloCAMTA 4	2,53	6,27E-59
12	EnigloAP2 6	-3,47	9,77E-04	EniglobHLH 59	2,51	1,65E-18
13	EnigloMYB related 37	-3,45	3,31E-09	EnigloM-type MADS 3	2,43	5,07E-17
14	EnigloNF-YB 4	-3,40	3,75E-16	EnigloERF 18	2,32	3,65E-08
15	EnigloWRKY 58	-3,35	2,38E-25	EnigloDof 2	2,14	9,39E-76
16	EnigloNF-YC 5	-3,33	3,44E-03	EniglobHLH 38	2,03	3,34E-12
17	EnigloB3 4	-3,32	8,60E-14	EnigloM-type MADS 4	1,95	2,10E-08
18	EnigloGRAS 26	-3,30	2,94E-12	EnigloERF 27	1,93	7,25E-04
19	EnigloHSF 5	-3,23	5,45E-27	EnigloNAC 25	1,93	1,33E-02
20	EniglobHLH 61	-3,17	7,17E-05	EnigloHSF 9	1,84	2,21E-13
21	EnigloMYB 65	-3,16	4,30E-06	EnigloERF 4	1,84	7,00E-03
22	EnigloWRKY 36	-3,16	1,81E-12	EnigloERF 21	1,69	8,98E-09
23	EnigloERF 24	-3,10	4,19E-08	EniglobHLH 8	1,63	6,25E-06
24	EnigloDof 9	-3,09	9,80E-06	EnigloNAC 53	1,62	2,53E-02
25	EnigloWRKY 2	-3,08	1,71E-23	EnigloNAC 50	1,62	4,73E-05
26	EniglobHLH 68	-3,07	1,53E-11	EnigloWhirly 1	1,51	3,96E-42
27	EniglobHLH 86	-2,98	2,48E-27	EnigloNAC 29	1,49	2,89E-07
28	EnigloGRAS 18	-2,98	3,03E-04	EnigloNAC 28	1,45	1,74E-12
29	EnigloARF 9	-2,94	2,33E-07	EnigloE2F/DP 1	1,44	2,49E-13
30	EnigloERF 14	-2,91	1,54E-10	EnigloNAC 13	1,41	2,57E-10
31	EniglobHLH 52	-2,86	5,77E-23	EniglobHLH 27	1,39	8,28E-07
32	EnigloMYB related 36	-2,76	2,49E-04	EnigloMYB related 31	1,35	1,43E-05
33	EniglobHLH 48	-2,70	2,40E-07	EnigloMYB 29	1,32	7,88E-03

34	EniglobHLH 76	-2,63	4,23E-13	EnigloB3 14	1,30	3,16E-15
35	EnigloYABBY 2	-2,61	1,50E-03	EnigloWRKY 16	1,30	4,38E-18
36	EnigloHSF 14	-2,47	6,88E-04	EnigloGRAS 30	1,27	9,65E-05
37	EniglobHLH 44	-2,47	3,29E-06	EnigloWRKY 60	1,27	7,00E-04
38	EnigloHSF 4	-2,46	9,66E-10	EnigloG2-like 3	1,24	1,43E-11
39	EnigloB3 2	-2,45	1,09E-07	EnigloERF 7	1,23	1,55E-05
40	EnigloMYB 66	-2,45	2,61E-05	EnigloMYB 16	1,20	1,10E-09
41	EnigloWRKY 72	-2,43	2,55E-06	EnigloDBB 3	1,18	6,77E-09
42	EnigloTrihelix 12	-2,38	3,68E-09	EnigloHSF 6	1,17	3,69E-12
43	EniglobHLH 98	-2,36	3,56E-08	EnigloHSF 10	1,13	1,87E-06
44	EnigloWRKY 67	-2,35	7,07E-04	EnigloNF-YB 1	1,12	5,61E-14
45	EniglobHLH 33	-2,29	1,10E-03	EnigloWRKY 1	1,11	1,10E-05
46	EnigloWRKY 39	-2,27	2,46E-07	EnigloTrihelix 8	1,06	3,53E-13
47	EnigloWRKY 49	-2,26	1,62E-28	EnigloMYB related 66	1,05	1,47E-04
48	EnigloZF-HD 1	-2,26	1,46E-06	EnigloNAC 7	1,05	5,06E-09
49	EnigloCO-Like 1	-2,24	7,00E-04	EnigloHB-Other 17	1,01	6,44E-10
50	EnigloWRKY 47	-2,23	2,72E-05	/	/	/
51	EnigloDof 3	-2,23	6,74E-16	/	/	/
52	EniglobHLH 36	-2,22	1,25E-08	/	/	/
53	EnigloAP2 7	-2,21	6,46E-17	/	/	/
54	EnigloWRKY 11	-2,19	7,23E-11	/	/	/
55	EnigloC3H 7	-2,19	6,08E-04	/	/	/
56	EnigloMYB related 68	-2,18	2,86E-31	/	/	/
57	EnigloGATA 8	-2,18	7,83E-06	/	/	/
58	EnigloGRAS 36	-2,16	2,76E-15	/	/	/
59	EnigloGeBP 3	-2,14	9,80E-06	/	/	/
60	EniglobHLH 65	-2,13	3,09E-10	/	/	/
61	EnigloMYB related 38	-2,13	1,20E-13	/	/	/
62	EniglobHLH 10	-2,12	3,58E-03	/	/	/
63	EnigloERF 15	-2,08	1,88E-06	/	/	/
64	EniglobHLH 42	-2,06	1,98E-10	/	/	/
65	EnigloGRAS 15	-2,05	9,08E-05	/	/	/
66	EnigloTrihelix 1	-2,04	8,24E-11	/	/	/
67	EniglobHLH 101	-2,04	2,40E-04	/	/	/
68	EnigloMYB 50	-2,03	5,08E-13	/	/	/
69	EnigloHB-Other 19	-2,02	1,32E-13	/	/	/
70	EnigloTrihelix 4	-1,97	6,87E-11	/	/	/
71	EnigloWRKY 12	-1,97	2,44E-04	/	/	/

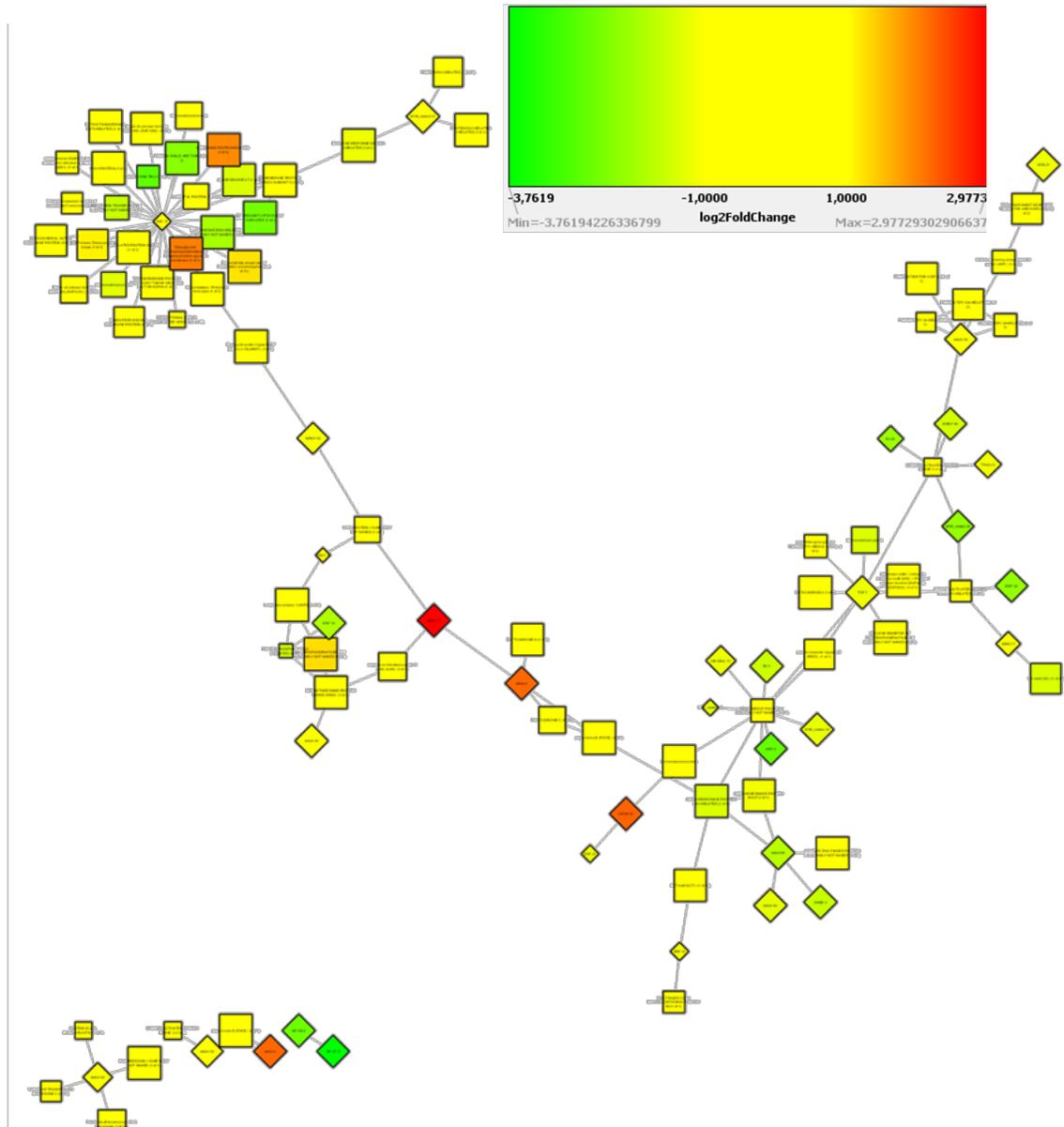
72	EnigloG2-like 21	-1,96	1,14E-03	/	/	/
73	EnigloHB-Other 9	-1,95	1,08E-02	/	/	/
74	EnigloGATA 7	-1,94	4,76E-12	/	/	/
75	EnigloTCP 9	-1,94	3,70E-03	/	/	/
76	EnigloTrihelix 6	-1,92	4,91E-08	/	/	/
77	EnigloWRKY 30	-1,91	5,10E-04	/	/	/
78	EnigloERF 34	-1,88	1,71E-26	/	/	/
79	EnigloNAC 23	-1,87	9,45E-05	/	/	/
80	EnigloWRKY 40	-1,87	4,75E-03	/	/	/
81	EnigloMYB 60	-1,86	2,77E-09	/	/	/
82	EnigloGRAS 13	-1,85	2,75E-08	/	/	/
83	EnigloGRF 4	-1,84	1,19E-02	/	/	/
84	EnigloMYB related 29	-1,83	4,30E-05	/	/	/
85	EnigloMYB 20	-1,82	4,04E-12	/	/	/
86	EnigloMYB related 61	-1,81	1,64E-08	/	/	/
87	EnigloERF 30	-1,79	4,85E-03	/	/	/
88	EnigloGRAS 37	-1,78	2,93E-04	/	/	/
89	EnigloERF 1	-1,78	4,14E-05	/	/	/
90	EnigloMYB 5	-1,78	4,46E-09	/	/	/
91	EnigloNAC 38	-1,77	6,12E-24	/	/	/
92	EnigloWRKY 66	-1,74	4,56E-06	/	/	/
93	EnigloWRKY 7	-1,70	4,08E-04	/	/	/
94	EnigloGeBP 1	-1,69	2,86E-06	/	/	/
95	EniglobHLH 51	-1,69	3,61E-04	/	/	/
96	EnigloNAC 18	-1,68	1,03E-06	/	/	/
97	EnigloNAC 35	-1,66	9,07E-05	/	/	/
98	EnigloFAR1 18	-1,65	2,05E-13	/	/	/
99	EnigloGRAS 40	-1,65	6,52E-05	/	/	/
100	EnigloHB-Other 5	-1,65	2,89E-22	/	/	/
101	EnigloMYB 49	-1,64	1,62E-15	/	/	/
102	EnigloGRAS 39	-1,64	1,06E-09	/	/	/
103	EnigloMYB related 51	-1,63	8,43E-03	/	/	/
104	EnigloDREB 7	-1,63	2,27E-03	/	/	/
105	EnigloMYB related 39	-1,63	1,16E-02	/	/	/
106	EnigloWRKY 54	-1,62	5,40E-11	/	/	/
107	EniglobHLH 53	-1,60	2,30E-07	/	/	/
108	EniglobHLH 82	-1,60	5,12E-05	/	/	/
109	EniglobHLH 15	-1,56	6,64E-06	/	/	/

110	EnigloDREB 2	-1,54	9,17E-06	/	/	/
111	EnigloG2-like 35	-1,53	2,36E-07	/	/	/
112	EnigloWRKY 73	-1,52	6,18E-03	/	/	/
113	EnigloNAC 8	-1,51	6,89E-05	/	/	/
114	EnigloMYB related 15	-1,50	1,28E-02	/	/	/
115	EnigloMYB related 63	-1,50	1,76E-02	/	/	/
116	EnigloTrihelix 18	-1,46	9,60E-05	/	/	/
117	EnigloWRKY 55	-1,46	1,32E-02	/	/	/
118	EnigloNAC 36	-1,46	5,13E-17	/	/	/
119	EnigloNF-YA 2	-1,44	3,50E-24	/	/	/
120	EnigloGRAS 12	-1,42	1,30E-05	/	/	/
121	EnigloSRS 1	-1,40	2,53E-08	/	/	/
122	EniglobHLH 50	-1,39	6,58E-06	/	/	/
123	EnigloWRKY 41	-1,39	1,17E-03	/	/	/
124	EnigloWRKY 6	-1,37	1,35E-05	/	/	/
125	EnigloMIKC MADS 8	-1,36	8,05E-04	/	/	/
126	EnigloNAC 14	-1,36	2,46E-06	/	/	/
127	EnigloARR-B 3	-1,32	2,45E-02	/	/	/
128	EnigloNAC 47	-1,31	2,07E-03	/	/	/
129	EnigloDof 10	-1,31	5,74E-20	/	/	/
130	EnigloWRKY 24	-1,30	8,01E-03	/	/	/
131	EnigloNAC 6	-1,29	1,85E-02	/	/	/
132	EnigloCPP 2	-1,29	7,68E-05	/	/	/
133	EnigloFAR1 20	-1,26	4,17E-16	/	/	/
134	EnigloM-type MADS 12	-1,25	4,43E-02	/	/	/
135	EnigloDof 13	-1,25	1,33E-02	/	/	/
136	EniglobHLH 21	-1,25	7,89E-10	/	/	/
137	EnigloMYB related 46	-1,24	1,39E-06	/	/	/
138	EnigloERF 6	-1,24	1,72E-04	/	/	/
139	EnigloC3H 10	-1,23	3,85E-02	/	/	/
140	EnigloMYB related 20	-1,22	1,20E-13	/	/	/
141	EnigloWRKY 34	-1,22	9,03E-03	/	/	/
142	EniglobZIP 7	-1,22	2,83E-03	/	/	/
143	EnigloHB-Other 7	-1,21	1,05E-03	/	/	/
144	EnigloHD-ZIP 1	-1,21	6,26E-09	/	/	/
145	EniglobZIP 16	-1,21	9,41E-07	/	/	/
146	EnigloGRAS 3	-1,20	1,89E-14	/	/	/
147	EniglobZIP 2	-1,17	2,73E-03	/	/	/

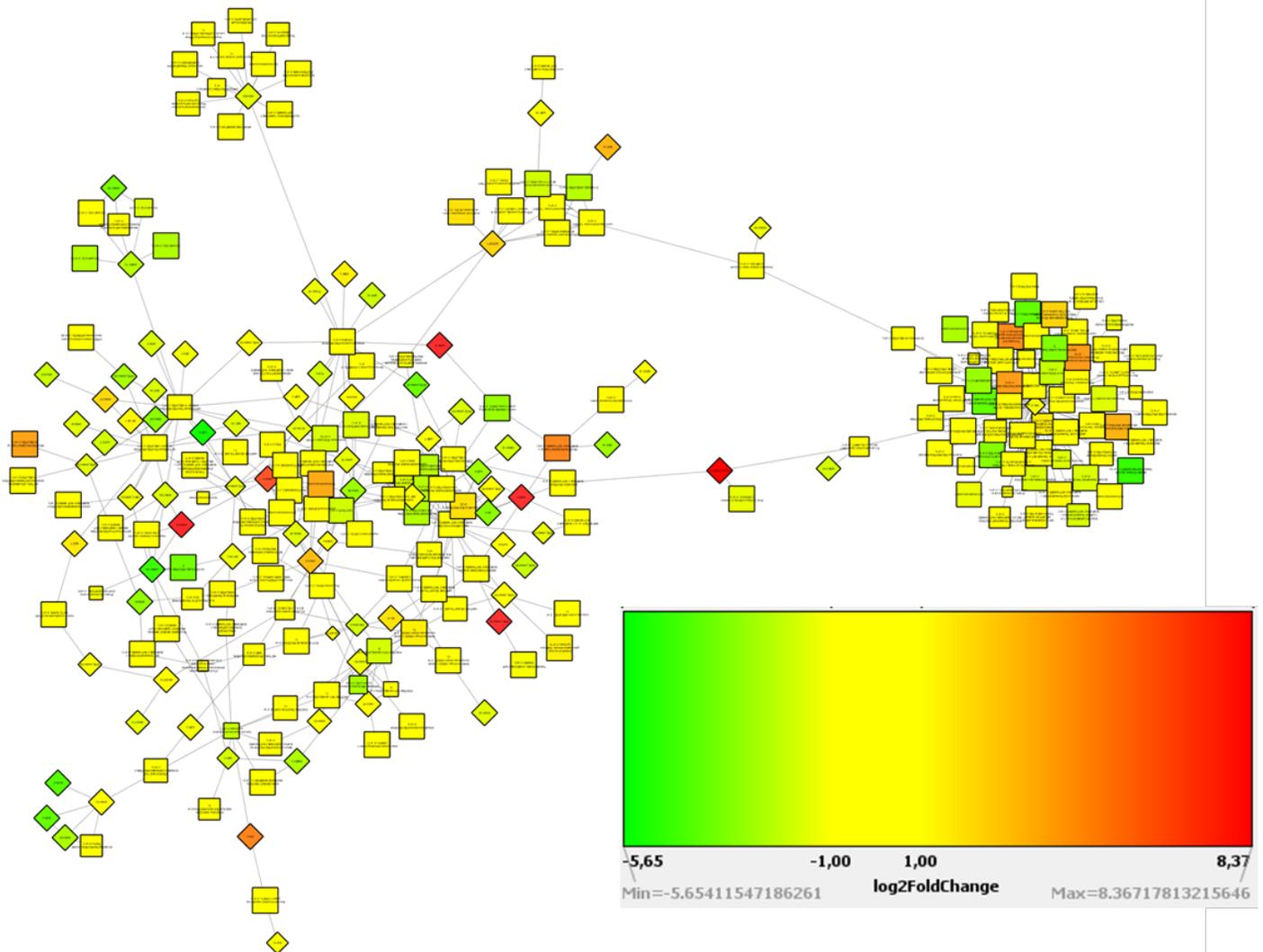
148	EniglobHLH 63	-1,17	4,79E-03	/	/	/
149	EnigloMYB related 24	-1,16	3,17E-02	/	/	/
150	EnigloHD-ZIP 4	-1,15	3,77E-02	/	/	/
151	EnigloMYB related 58	-1,15	7,36E-03	/	/	/
152	EnigloNAC 19	-1,15	2,41E-05	/	/	/
153	EnigloWRKY 22	-1,14	6,55E-03	/	/	/
154	EnigloHB-Other 15	-1,13	1,11E-03	/	/	/
155	EnigloMYB related 64	-1,13	6,23E-04	/	/	/
156	EnigloHSF 7	-1,13	2,49E-05	/	/	/
157	EniglobHLH 80	-1,12	5,70E-05	/	/	/
158	EnigloHB-Other 12	-1,12	1,27E-07	/	/	/
159	EnigloMYB 10	-1,11	1,86E-03	/	/	/
160	EnigloMYB related 60	-1,10	1,62E-16	/	/	/
161	EnigloTCP 3	-1,08	4,99E-03	/	/	/
162	EnigloARF 3	-1,07	4,32E-10	/	/	/
163	EnigloGATA 9	-1,07	4,18E-03	/	/	/
164	EniglobHLH 47	-1,07	3,62E-04	/	/	/
165	EnigloDREB 4	-1,06	2,01E-02	/	/	/
166	EniglobHLH 81	-1,06	1,21E-03	/	/	/
167	EnigloMYB related 69	-1,04	1,11E-05	/	/	/
168	EnigloNAC 42	-1,01	2,81E-07	/	/	/
169	EniglobHLH 95	-1,01	4,13E-02	/	/	/
170	EnigloHD-ZIP 12	-1,00	7,24E-04	/	/	/
171	EnigloHD-ZIP 6	-1,00	1,56E-03	/	/	/



Apéndice 19. Interactoma entre NA y AAH de los factores de transcripción anotados en el híbrido *E. nitens* x *E. globulus* que presentaron valores de Log₂FC superior a 1 (rojo) e inferior a -1 (verde) con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos de *E. grandis*.
 Rombo: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*



Apéndice 20. Interactoma entre AAH y ADH de los factores de transcripción anotados en el híbrido *E. nitens x E. globulus* que presentaron valores de Log_2FC superior a 1 (rojo) e inferior a -1 (verde) con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*.
 Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.



Apéndice 21. Interactoma entre NA y ADH de los factores de transcripción anotados en el híbrido *E. nitens* x *E. globulus* que presentaron valores de Log_2FC superior a 1 (rojo) e inferior a -1 (verde) con Transcritos alineados con péptidos y nucleótidos *E. grandis*.
 Rombos: factores de transcripción, Rectángulo: transcritos alineados con *E. grandis*.