



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y DE LA
CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES
DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA Y CONSERVACIÓN DE LA
NATURALEZA

DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE *Porlieria chilensis* (I.M. Johnst.) FRENTE A RESTRICCIÓN HÍDRICA.

Memoria para optar al Título

Profesional de Ingeniero Forestal

DIEGO IGNACIO VILLALOBOS GATICA

Profesor Guía:

Carlos R. Magni D. Dr. Ing. Forestal

Santiago, Chile
2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y DE LA
CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES
DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA Y CONSERVACIÓN DE LA
NATURALEZA

DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE *Porlieria chilensis* (I.M. Johnst.) FRENTE A RESTRICCIÓN HÍDRICA.

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

DIEGO IGNACIO VILLALOBOS GATICA

Calificaciones:	Nota	Firma
Profesor Guía: Dr. Carlos Magni D.	...7,0...
Profesor Consejero: Dr. Víctor Martínez M.	...7,0...
Profesora Consejera: Dra. Karen Peña R.	...6,5...

DEDICATORIA

Dedicada a mi mamá, mi papá, mi hermano que me apoyaron incondicionalmente durante todo el transcurso de mi carrera.

Por último, dedicada a todos aquellos que me ayudaron a encontrar mi fascinación y amor por la naturaleza.

“El núcleo básico del espíritu vivo de un hombre es su pasión por la aventura. La alegría de vivir proviene de nuestros encuentros con nuevas experiencias y por eso no hay mayor alegría que tener un horizonte infinitamente cambiante, que cada día tenga un sol nuevo y diferente”

-Christopher McCandless.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en general a todo el equipo de la Universidad de Chile, profesores, ayudantes y compañeros que me ayudaron a crecer como estudiante y persona a lo largo de estos cinco años.

Agradezco a mi profesor guía, Carlos Magni, por encaminarme en el desarrollo de este trabajo, y su gran paciencia para enseñarme y corregirme en varios aspectos del mismo. También a mis profesores consejeros, Víctor Martínez y Karen Peña por los consejos y correcciones del escrito.

Al profesor Antonio Vita por propocionarme información relevante para la discusión del trabajo.

A Jessica Dörner por enseñarme a utilizar diferentes programas requeridos para la realización de la memoria.

Al equipo de CESA F y del Laboratorio de Genómica de FAVET por otorgarme los materiales necesarios para la realización del escrito.

A toda mi familia por confiar en mí y darme las herramientas para estudiar con tranquilidad, aún más en tiempos de pandemia y estar ahí siempre para ayudarme.

Por último y no menos importante, a mis amigos y amigas, que me motivaron a seguir estudiando y trabajaron junto a mí para llegar hasta dónde estoy hoy, además de darme tantas risas que hicieron de mi pasar en la universidad mucho más feliz.

A Bernys y Damaris por escucharme en los momentos más difíciles de cada año y darme coraje para seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes de diversidad y diferenciación genética	2
1.1.1 Diversidad y diferenciación genética	2
1.1.2 Marcadores moleculares y SNPs.....	4
1.1.3 Metabolismo y análisis de expresión génica diferencial	5
1.1.4 Moléculas relacionadas a la tolerancia por estrés por restricción hídrica y sequía.....	5
1.2. Antecedentes de Mega Sequía	7
1.2.1 Definición y causas	7
1.2.2 Efectos en el ambiente y la vegetación.....	7
1.2.3 Déficit hídrico, potencial hídrico y respuesta al estrés hídrico	8
1.3. Antecedentes de <i>Porlieria chilensis</i>	8
1.3.1 Descripción morfológica, distribución geográfica y área de presencia.....	8
1.3.2 Amenazas y conservación.....	9
1.3.3 Ecología de la especie	9
1.3.4. Evaluación morfofisiológica de la restricción hídrica en guayacán	10
1.4. Objetivos	12
1.4.1 Objetivo general:	12
1.4.2 Objetivos específicos:	12
2. MATERIALES Y MÉTODO	13
2.1 MATERIALES	13
2.1.1 Resumen del diseño experimental para construcción de la base de datos	13
2.1.2 Base de datos.....	14
2.2 MÉTODO	15
2.2.1 Procedimiento para caracterizar marcadores SNP	15
2.2.2 Potencial hídrico de poblaciones de guayacán según condición	15
2.2.3 Determinación de la diversidad y diferenciación genética	15
2.2.4 Identificación de rutas, componentes y funciones expresadas	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1 Diversidad y diferenciación genética de <i>Porlieria chilensis</i>	18
3.1.1 Diversidad genética de <i>Porlieria chilensis</i>	18

3.1.2 Diferenciación genética de <i>Porlieria chilensis</i>	20
3.2. Caracterización de marcadores moleculares tipo SNPs	22
3.2.1 Anotación de genes	22
3.2.2 Marcadores moleculares SNPs	24
3.2.3 Análisis de SNPs expresados diferencialmente	24
3.3 Rutas, componentes y funciones expresadas	29
4. CONCLUSIONES	36
5. BIBLIOGRAFÍA	37
6. ANEXOS Y APÉNDICES	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), índice de fijación (F_{st}) entre poblaciones de especies nativas con sus respectivos marcadores.	3
Cuadro 2. Pares de bases leídas y filtradas para los cinco individuos de guayacán de Colina con riego normal.	14
Cuadro 3. Resultados ensamblaje de novo.	14
Cuadro 4. Cálculo de F_{st} para las combinaciones de las dos poblaciones (Colina y El Melón) en dos condiciones.	15
Cuadro 5. Diversidad genética observada (H_o) entre poblaciones.	18
Cuadro 6. Diversidad genética esperada (H_e) entre poblaciones.	18
Cuadro 7. Diferenciación genética (F_{st}) entre poblaciones.	21
Cuadro 8. Resumen de los resultados de búsqueda, mapeo y anotación de homología blast del transcriptoma de <i>P. chilensis</i> expresado diferencialmente bajo restricción hídrica.	23
Cuadro 9. Número de SNPs bajo equilibrio de Hardy-Weinberg.	24
Cuadro 10. Número de marcadores SNPs en común entre comparaciones y sus respectivos totales.	24
Cuadro 11. Número de SNPs sobre y sub expresados para Colina_e vs Colina_n.	27
Cuadro 12. Términos GO involucrados en la respuesta a la sequía.	28
Cuadro 13. Glosario.	48
Cuadro 14. P-value y valores de potencial hídrico (Ψ) para las poblaciones.	49
Cuadro 15. Términos GO con posible implicancia en la respuesta a la sequía.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método para la identificación de SNPs.	5
Figura 2. Funciones de productos génicos o genes inducibles por estrés por sequía en la tolerancia y respuesta al estrés.	7
Figura 3. Diseño experimental de 20 individuos de guayacán obtenidos de la comuna de Colina y El Melón.	13
Figura 4. Ejemplo estructura para describir genes o productos génicos relacionados a rutas, componentes y funciones expresadas.	17
Figura 5. Distribución de especies de los mejores resultados de BLAST para todas las secuencias homólogas.	23
Figura 6. Seis términos GO presentes en SNPs con mayor número de repeticiones correspondientes a Funciones Moleculares.	25
Figura 7. Seis términos GO presentes en SNPs con mayor número de repeticiones correspondientes a componentes Celulares.	26
Figura 8. Seis términos GO presentes en SNPs con mayor número de repeticiones correspondientes a procesos biológicos.	26
Figura 9. Ruta de funciones moleculares.	30
Figura 10. # Secuencias de funciones moleculares.	31
Figura 11. Ruta de componentes celulares.	32
Figura 12. # Secuencias de componentes celulares.	33
Figura 13. Ruta de procesos biológicos.	34
Figura 14. # Secuencias de procesos biológicos.	35
Figura 15. Pasos para el filtrado y control de calidad de secuencias.	51
Figura 16. Pasos para el ensamblaje de novo.	52
Figura 17. Procesamiento para el análisis de expresión diferencial.	53
Figura 18. Rutas metabólicas de funciones moleculares (1).	59
Figura 19. Rutas metabólicas de funciones moleculares (2).	59
Figura 20. Rutas metabólicas de componentes celulares.	60
Figura 21. Rutas metabólicas de procesos biológicos (1).	60
Figura 22. Rutas metabólicas de procesos biológicos (2).	61
Figura 23. Rutas metabólicas de procesos biológicos (3).	61
Figura 24. Rutas metabólicas de procesos biológicos (4).	61
Figura 25. Rutas metabólicas de procesos biológicos (5).	62
Figura 26. Rutas metabólicas de procesos biológicos (6).	62

RESUMEN

El actual fenómeno de la Mega Sequía provoca cambios negativos en las condiciones ambientales para muchas especies nativas. Esto sugiere la necesidad de identificar poblaciones y/o individuos con genes que presenten un mayor nivel de expresión, y confieran aclimatación y adaptación frente a dichos cambios, permitiendo un mejor desarrollo y sobrevivencia de estas especies. Por otra parte, la diversidad y diferenciación genética pueden usarse como instrumentos de conservación al identificar y caracterizar genes con funciones importantes que juegan un rol en la adaptación a un hábitat cambiante.

La presente memoria tiene como objetivo estimar la diversidad y diferenciación genética de *Porlieria chilensis* (guayacán) en dos poblaciones (Colina y El Melón), sometidas a un experimento de restricción hídrica. Para esto se describirán genes con funciones relevantes en el metabolismo y que se expresan diferencialmente bajo condiciones de riego y restricción hídrica. Además, se caracterizarán marcadores moleculares de tipo Polimorfismo de Nucleótido Único (*SNP* en inglés) y se identificarán rutas, componentes y funciones expresadas. A partir, de una base de datos desarrollada por experimentos previos se expresaron, secuenciaron y clasificaron 2.985 marcadores moleculares tipo *SNP*. Los resultados indican que en promedio los valores de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e), para las dos poblaciones analizadas son de un 0,3794 (Colina) y 0,2747 (El Melón); mientras que el valor de índice de fijación (F_{st}) entre ambas poblaciones es de 0,0069. De los 2.985 *SNPs*, se encontró que la gran mayoría (78%) de estos están bajo equilibrio de Hardy-Weinberg. De estos *SNPs* se detectan 200 que se sub- o sobre- expresan diferencialmente en diversos procesos biológicos involucrados en la respuesta a la restricción hídrica, tales como canales de agua, chaperonas, proteasas y quinasas. Además, se describe una de las rutas metabólicas, donde se indican seis importantes procesos para la biología de guayacán (“Proceso celular”, “Proceso metabólico”, “Regulación biológica”, “Regulación de procesos biológicos”, “Localización”, y “Respuesta a estímulos”). En conclusión, ambas poblaciones presentan valores altos de diversidad genética en comparación a otras especies con rasgos taxonómicos similares. Además, se evidencia una baja diferenciación genética, lo que indica una escasa o nula estructuración genética de estas dos poblaciones analizadas. Por otra parte, la expresión de *SNPs* en procesos biológicos guarda relación con la restricción hídrica tales como traducción, procesos de oxido-reducción y fosforilación. Lo anterior muestra el impacto de la restricción hídrica a nivel molecular, donde la mayoría de los *SNPs* tienen una sobre expresión, aumentando su actividad o su contenido.

Palabras Clave: *Porlieria chilensis*, diversidad y diferenciación genética, *SNP*, Función molecular, Componente celular, Proceso biológico.

ABSTRACT

The current Mega-Drought phenomenon causes negative changes in environmental conditions for many native species. This suggests the need to identify populations and / or individuals with genes that present a higher level of expression and confer acclimatization and adaptation to these changes, allowing better development and survival of these species. On the other hand, genetic diversity and differentiation can be used as conservation tools by identifying and characterizing genes with important functions that play a role in adaptation to a changing habitat.

The purpose of this report is to estimate the diversity and genetic differentiation of *Porlieria chilensis* (Guayacán) in two populations (Colina and El Melón) subjected to a water restriction experiment. For this, genes with relevant functions in metabolism and that are differentially expressed under irrigation conditions and water restriction will be described. In addition, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers will be characterized and expressed routes, components and functions will be identified. From a database developed by previous experiments, 2,985 SNP-type molecular markers were expressed, sequenced and classified. The results indicate that on average the observed heterocigosity (H_o) and expected heterocigosity (H_e) values, for the two populations analyzed are 0.3794 (Colina) and 0.2747 (El Melón); while the value of fixation index (F_{st}) between both populations is 0.0069. Of the 2,985 SNPs, the vast majority (78%) of these were found to be under Hardy-Weinberg equilibrium. Of these SNPs, 200 are detected that are differentially under- or overexpressed in various biological processes involved in the response to water restriction, such as water channels, chaperones, proteases and kinases. In addition, one of the metabolic routes is described, where six important important processes for the biology of Guayacán are indicated ("Cell process", "Metabolic process", "Biological regulation", "Regulation of biological processes", "Localization", and "Response to stimuli"). In conclusion, both populations present high values of genetic diversity compared to other species with similar taxonomic traits. In addition, a low genetic differentiation is evidenced, which indicates little or no genetic structuring of these two populations analyzed. On the other hand, the expression of SNPs in biological processes is related to water restriction such as translation, oxidation-reduction processes and phosphorylation. The above shows the impact of water restriction at the molecular level, where most SNPs have an overexpression, increasing their activity or content.

Keywords: *Porlieria chilensis*, diversity and genetic differentiation, SNP, Molecular Function, Cellular Component, Biological Process.

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad y diferenciación genética pueden usarse como instrumento de conservación, al identificar genes con funciones importantes que juegan un rol en la adaptación al hábitat, permitiendo la selección de individuos que presenten dichos genes dentro de un programa de mejoramiento genético, con el fin de reproducir plantas más resistentes y mejor adaptadas (Collada y Jiménez, 2008). Además, valores altos de diversidad genética indican, para una población, una mayor probabilidad de sobrevivir y capacidad de adaptación frente a cambios en su ambiente (Ipinza, 2015). Lo anterior tiene una estrecha relación con el ámbito forestal bajo el actual fenómeno de la Mega Sequía que provoca cambios negativos en las condiciones ambientales de muchas especies nativas (Bambach *et al.*, 2013), debido a esto surge la necesidad de la búsqueda de individuos con genes que expresen funciones relacionadas a la adaptación ante dichos cambios, permitiendo un mejor desarrollo y sobrevivencia de estas especies.

Un aspecto que puede ser abordado en este contexto es el metabolismo de las plantas, responsable de las reacciones que realizan las células en la planta y que cumplen determinadas funciones (Carril y García, 2009), del cual se puede comprender mejor su funcionamiento, si se conoce los genes responsables de su expresión frente a condiciones adversas como por ejemplo; bajo restricción hídrica. Una herramienta usada para caracterizar los genes, cuantificar la diversidad y diferenciación genética de especies forestales son los marcadores genéticos (Moreno-Letelier, 2007), uno de ellos corresponde a los polimorfismos de nucleótido único (SNP), los cuales han dado resultados más fiables y robustos sobre la estructura genética que otros marcadores, como los microsatélites al ser usado en otras especies (Fischer *et al.*, 2017).

El análisis de expresión diferencial, que puede basarse en el uso de SNPs, localiza genes que se expresan diferencialmente en una población con respecto a una condición control, lo que permite conocer y cuantificar la expresión de los genes midiendo el ARN presente en un momento determinado (Giménez, 2017). Por lo que, esta herramienta puede aplicarse para identificar genes que son activados en cierta condición y que a la vez guarden relación con procesos sobre el desarrollo de un individuo, generando información para una futura selección de genes asistida por marcadores, para reproducir plantas que se puedan desarrollar de manera óptima, tanto en condiciones normales como de restricción hídrica (Zhuanfang *et al.*, 2011).

La Mega Sequía ha generado una reducción importante en la precipitación en el centro del país (Garreaud *et al.*, 2020), afectando negativamente a la vegetación de bosques nativos y matorrales de la ecorregión mediterránea (Garreaud *et al.*, 2017). Modelos proyectados, para el siguiente siglo, indican una disminución en el área de distribución para todas las especies del ecosistema mediterráneo a causa de este fenómeno climático (Bambach *et al.*, 2013). Una de las especies afectadas es *Porlieria chilensis* (I. M. Johnst), la que en base a un modelo propuesto por Loayza *et al.* (2015), se predice una reducción de a lo menos el 60% de su distribución potencial actual en los próximos 100 años.

Porlieria chilensis (guayacán), es una especie endémica de Chile, que corresponde a un arbusto o árbol siempre verde que se distribuye entre las regiones de Coquimbo y de

O'Higgins, con relevancia ecológica en sectores áridos y semiáridos, encontrándose tanto en zonas costeras como en la Cordillera de Los Andes (Hechenleitner *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2008). Categorizada oficialmente como “Vulnerable” en el 2008 por el Ministerio de Medio Ambiente (de aquí en adelante abreviado MMA), clasificación que no ha cambiado, la especie guayacán se encuentra fragmentada en subpoblaciones con una muy baja densidad, debido a su sobreutilización en el pasado y se espera que su población siga disminuyendo en los años por venir (Loayza *et al.*, 2015).

En vista de lo anterior, la siguiente memoria busca analizar la diversidad y diferenciación genética relacionada a genes que están asociados a la expresión de rutas, funciones y procesos metabólicos en dos poblaciones de guayacán bajo condiciones de restricción hídrica. Esto permitirá aportar al conocimiento de genes con un rol importante en el metabolismo de la especie que se expresan bajo condiciones de riego restringidas, permitiendo su uso para estudios posteriores en relación al desarrollo y mejoramiento de guayacán ante condiciones con escasa disponibilidad de agua.

A continuación, se presentan los antecedentes generales más importantes acerca de la diversidad y diferenciación genética, la Mega Sequía y de la especie analizada, *Porlieria chilensis*.

1.1 Antecedentes de diversidad y diferenciación genética

En primer lugar, se dan a conocer los antecedentes más relevantes de diversidad y diferenciación genética.

1.1.1 Diversidad y diferenciación genética

Se denomina a la diversidad genética al número total de características genéticas dentro de cada especie, o a la variabilidad de alelos y genotipos presentes en un grupo estudiado, sea una población, una especie o un conjunto de especies. Una diversidad genética alta indica mayores posibilidades para que una especie sobreviva frente a cambios en el ambiente, mientras especies con poca diversidad genética poseen un mayor riesgo. Esta diversidad se ve aumentada por la existencia de flujo genético, mutaciones y procesos de recombinación génica; y se ve disminuida por la selección natural, autofecundación, endogamia y deriva genética. La diversidad genética es frecuentemente conocida como la heterocigosidad esperada, que se define como la probabilidad de que dos alelos sean diferentes cuando se muestrean dos gametos de un cierto locus al azar o también, como la proporción de organismos heterocigotos calculada en base al equilibrio de Hardy-Weinberg; mientras la heterocigosidad observada es la proporción de organismos heterocigotos calculada en base a los genotipos observados en una muestra poblacional (Ipinza, 2015; Tripp, 2009).

En el Cuadro 1 se presentan los valores de heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), índice de fijación (F_{st}), para poblaciones de diversas especies nativas, con el tipo de marcador que se usó para calcular estos parámetros.

Cuadro 1. Heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), índice de fijación (Fst) entre poblaciones de especies nativas con sus respectivos marcadores. La referencia bibliográfica se señala con el número del autor entre paréntesis que se indica al final de cada cita de la bibliografía.

Especie	Tipo de marcador	Ho	He	Fst	Referencia
<i>Nothofagus alessandrii</i>	Azm	0,176	0,1820	0,257a	(102)
<i>Nothofagus alpina</i>	Azm	0,173	-	0,0380	(59)
<i>Nothofagus dombeyi</i>	SNP	0,250	-	0,1116	(41)
<i>Nothofagus nitida</i>	Azm	0,036	0,045	0,047a	(85) y (86)
<i>Nothofagus obliqua</i>	Azm	0,600	0,662	0,0510	(4) y (107)
<i>Monttea chilensis</i>	ADNcp	-	-	0,9030	(7)
<i>Aextoxicon punctatum</i>	ISSR	0,705	0,7125		(75)
<i>Austrocedrus chilensis</i>	Azm	0,203	0,255	0,1160	(97)
<i>Beilschmiedia miersii</i>	ISSR	0,230	-	0,0500	(64)
<i>Eriogyne chilensis</i>	AFLP	-	0,3194	0,0863	(101)
<i>Eriogyne chilensis</i> var. <i>albidiflora</i>	AFLP	-	0,3156	0,1096	(101)
<i>Eriogyne subgibbosa</i>	AFLP	-	0,3210	0,1123	(101)
<i>Eriogyne curvispina</i> var. <i>mutabilis</i>	AFLP	-	0,3420	0,1650	(101)
<i>Pouteria splendens</i>	AFLP	-	-	0,020b	(10)
<i>Prosopis chilensis</i>	SSR	0,590	0,700	0,0300	(11)
<i>Quillaja saponaria</i>	SSR	0,541	0,5614	-	(53)

AFLP = Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, Azm = Aloenzimas, ISSR= Inter Microsatélites, SSR = Microsatélites, y A y B hacen referencia a dos medidas de diferenciación genética similar a Fst, donde a = Gst y b = PhiPT.

Cabe mencionar que, al usar diferentes marcadores moleculares, las estimaciones de diversidad genética pueden variar significativamente. En un estudio con poblaciones de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze, se determinó que con marcadores microsatélites los valores de Ho y He eran 0,644 y 0,708, mientras usando marcadores tipo SNPs eran 0,311 y 0,312 respectivamente (Silva *et al.*, 2020).

Por su parte, Holsinger y Weir (2009) indican que Sewall Wright introdujo el estadístico Fst, definido como la correlación de alelos elegidos al azar dentro de la misma subpoblación en relación con toda la población y es una medida de la diferenciación genética, la que provee información clave acerca de los procesos evolutivos que influyen en la estructura de la variación genética dentro y entre las poblaciones. Los valores de Fst van de 0 a 1, donde cero indica que no hay diferencia entre poblaciones, es decir los grupos analizados son idénticos y uno la máxima diferencia entre poblaciones analizadas. Los rangos de diferenciación genética (Fst) son de 0 a 0,05, poca, 0,051 a 0,15 moderada, de 0,151 a 0,25 grande y muy grande de 0,25 a 1. Estimaciones de Fst permiten identificar regiones del genoma que han estado sujetas a selección y las comparaciones de esta diferenciación en diferentes partes del genoma pueden entregar información sobre la historia demográfica de las poblaciones,

teniendo un rol central en la población y la genética evolutiva con aplicaciones en diversos campos (Holsinger y Weir, 2009).

Al igual que con la diversidad genética en términos de H_o y H_e , hay un cambio en la medición según el tipo de marcador que se usa. Silva *et al.* (2020), calculan para *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze un F_{st} con microsatélites de 0,110, mientras para SNP se obtuvo un valor tres veces superior de 0,318, lo que lo convierte en un aspecto a tomar en cuenta al momento de comparar resultados con el de otros autores.

Es posible usar la genética como instrumento de conservación al permitir diagnosticar y prevenir el riesgo de pérdida de viabilidad en una determinada unidad de estudio, como por ejemplo una especie, y en particular aquellas que se encuentran en alguna categoría de peligro (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2019), además hace posible la selección de individuos con características favorables y heredables de importancia económica en planes de mejora, como también en programas de restauración, ayudando a identificar individuos con una alta o poca variabilidad que pueden estar o no diferenciados en su adaptación al hábitat (Collada y Jiménez, 2008). Por último, una herramienta para cuantificar la diversidad y diferenciación genética de especies forestales son los marcadores genéticos (Moreno-Letelier, 2007), siendo estos de interés para el presente estudio.

1.1.2 Marcadores moleculares y SNPs

Los marcadores moleculares o genéticos, se definen como un segmento de ADN cuya ubicación física en un cromosoma es conocida, utilizándose para rastrear la herencia de un gen cercano aún no identificado, pero cuya localización aproximada es conocida (NIH, S.A (a)). Proveen una estimación de la diversidad genética neutral, que es aquella variación no determinada por selección natural, existiendo diferentes tipos de marcadores que según las características de la molécula o el fragmento de molécula analizado entregan distinta información (Collada y Jiménez, 2008). Gracias a los marcadores es posible establecer relaciones de paternidad y parentesco, relaciones filogenéticas, o analizar qué procesos afectan a las poblaciones por ejemplo; migración y deriva génica (Collada y Jiménez, 2008).

Un tipo de marcador molecular corresponde a los polimorfismos de nucleótido único (SNP), que generan una variación en solo un par de bases en la secuencia del genoma (NIH, S.A (b)). Estudios recientes indican que los SNPs proporcionan una mejor calidad de datos, resultados de análisis de ADN más precisos y con un mayor contenido de información que otros marcadores (Zhuanfang *et al.*, 2011). Para la identificación de SNPs se hace uso de contigs (para más definiciones ver Apéndice 1), los que recrean una sección de la cadena del ADN superponiendo varios segmentos de ADN de diversas muestras, los que al variar en una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina y timina), entre individuos para un lugar en el cromosoma permiten obtener un SNP. En la siguiente figura se ejemplifica lo que es un SNP.

	INDIVIDUO 1	INDIVIDUO 2
Cromosoma 1	5' ...ACCAT T GCAG...3'	5' ...ACCAT T GCAG...3'
	3' ...TGGT A ACGTC...5'	3' ...TGGT A ACGTC...5'
Cromosoma 2	5' ...ACCA T GCAG...3'	5' ...ACCA C GCAG...3'
	3' ...TGGT A ACGTC...5'	3' ...TGGT G ACGTC...5'

Figura 1. Método para la identificación de SNPs.

En el ejemplo ilustrado en la Figura 1, para el cromosoma 2 del individuo 1 en la posición marcada en el recuadro amarillo existe una timina (T), mientras para el individuo 2 en el mismo lugar hay una citosina (C), existiendo un SNP para esa posición del genoma de esa especie.

1.1.3 Metabolismo y análisis de expresión génica diferencial

El metabolismo de las plantas es responsable de las reacciones que realizan las células en la planta y que cumplen determinadas funciones. Conocer los genes responsables de su expresión frente a condiciones adversas como por ejemplo; bajo restricción hídrica puede ayudar a comprender mejor su funcionamiento (Carril y García, 2009). Mediante el estudio de la diversidad y diferenciación genética se puede identificar genes que estén relacionados a las rutas, funciones y procesos metabólicos expresados y en qué grado lo hacen bajo condiciones de restricción hídrica.

La expresión génica diferencial es el proceso por el que las células son capaces de decodificar la información dentro del ADN, para elaborar un producto génico con un rol clave en el buen funcionamiento del organismo. Es posible revelar estos productos a partir del ARN en un análisis de expresión diferencial, el que permite identificar genes que se expresan diferencialmente en relación a una condición control, pudiendo observar si la producción de proteínas en las células exhiben un comportamiento distinto cuando son sometidas a diversos estímulos, por ejemplo, una exposición mayor a la radiación o una variación en los niveles de agua disponible (Giménez, 2017). En base a lo anterior, es posible utilizar un análisis de la expresión diferencial para identificar que genes son activados y cuales son apagados bajo cierta condición, los cuales además estén relacionados con procesos claves en el desarrollo de un individuo por ejemplo; bajo restricción hídrica, generando así información para una futura selección de genes asistida por marcadores ,para reproducir plantas que se puedan desarrollar de manera óptima tanto en condiciones normales como bajo restricción hídrica (Zhuanfang *et al.*, 2011).

1.1.4 Moléculas relacionadas a la tolerancia por estrés por restricción hídrica y sequía

Varela (2010), describe que existen tres tipos de mecanismos de respuesta al estrés de las plantas: De evasión, donde la planta retrasa el efecto del factor estresante; de escape, la planta no puede evitar el factor estresante y se confina a espacios sin estrés o adapta su ciclo de vida a períodos más favorables; y de tolerancia que es donde la planta soporta la acción del factor del estrés, osea le permite seguir funcionando aún bajo los efectos del estrés. Respecto a este último, con el fin de sobrevivir bajo condiciones de restricción hídrica, las plantas son capaces de responder mediante una serie de procesos fisiológicos, celulares y moleculares que se

derivan en tal tolerancia al estrés. Diversos genes inducibles por sequía con variadas funciones se han determinado por medio de análisis moleculares y genómicos en *Arabidopsis*, arroz y otras plantas, incluyéndose factores de transcripción que median la expresión génica inducible por estrés. Los productos de genes inducibles por estrés tienen funciones en la respuesta inicial al estrés y en el establecimiento de la tolerancia al estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

En *Arabidopsis* los productos de genes inducibles por sequía determinados mediante análisis de microarrays pueden clasificarse en dos grupos. El primero incluye proteínas con posibles funciones en la tolerancia al estrés abiótico. Dentro de estos se encuentran las moléculas conocidas como chaperonas, proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés), proteínas anticongelantes, osmotina, proteínas de unión a ARNm, enzimas clave para la biosíntesis de osmolitos, proteasas y proteínas del canal de agua, entre otras. El segundo grupo lo constituyen proteínas reguladoras, o sea, factores proteicos involucrados en la regulación adicional de la transducción de señales y la expresión génica sensible al estrés. Se incluyen diversos factores de transcripción, proteínas fosfatasa, quinasas y moléculas de señalización entre otras. Una gran cantidad de genes de factores de transcripción eran inducibles por estrés, lo que sugiere que diversos mecanismos reguladores de transcripción tienen funciones en la regulación de las vías de transducción de señales de estrés por sequía, alta salinidad o frío. Posiblemente, estos factores de transcripción gobiernan la expresión de genes inducibles por estrés, ya sea de forma independiente o cooperativa, constituyendo redes de genes en el género *Arabidopsis* (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Semejantemente a *Arabidopsis*, los productos de genes inducibles por estrés determinados en el arroz, pueden también clasificarse en proteínas funcionales y proteínas reguladoras (Rabbani *et al.*, 2003). Un análisis comparativo entre los genes inducibles por estrés en *Arabidopsis* y los del arroz indicó una similitud considerable en las respuestas al estrés entre los dos genomas. Dentro de los 73 genes que se identificaron como inducibles por estrés en el arroz, se indicó que 51 en *Arabidopsis* poseen una función parecida. Lo anterior confirma que, aunque estas dos plantas comparten genes inducibles por estrés en común, aun cuando evolucionaron de forma separada hace más de un millón de años. En base a lo anterior, es posible usar los productos génicos, ya descritos en *Arabidopsis*, para comprender mejor la función de genes que se expresan bajo sequía en *Portieria chilensis*, una especie poco estudiada (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Los productos génicos detallados para *Arabidopsis* dentro del estudio de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (2007) se presentan a continuación.

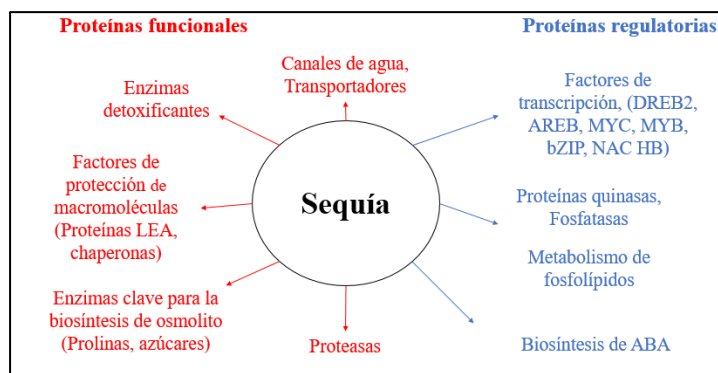


Figura 2. Funciones de productos génicos o genes inducibles por estrés por sequía en la tolerancia y respuesta al estrés. Se clasifican en dos grupos los productos genéticos. Fuente: Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (2007).

1.2. Antecedentes de Mega Sequía

A continuación, se dan a conocer los antecedentes más relevantes de la Mega Sequía.

1.2.1 Definición y causas

Se define como Mega Sequía al periodo constante de años secos que ha prevalecido en Chile central desde el año 2010 (Garreaud *et al.*, 2017). Este fenómeno ha implicado la disminución de la precipitación en el centro del país, alcanzando al día de hoy déficits de lluvia anuales que varían entre el 25 y el 45% (Garreaud *et al.*, 2020). A grandes rasgos, tanto la variabilidad natural como las acciones antropogénicas juegan un papel clave en sostener la Mega Sequía en Chile central, de la cual se atribuye al componente natural al menos la mitad del efecto de la sequía, y un cuarto al accionar del hombre (Garreaud *et al.*, 2020), y cuyos efectos en especies nativas de esta zona del país han sido significativamente negativos (Bambach *et al.*, 2013).

1.2.2 Efectos en el ambiente y la vegetación

Garreaud *et al.* (2017), indican que durante el periodo 2010-2015 el déficit de precipitación afectó la capa de nieve subtropical de los Andes, con una reducción cercana al 30% en agua de nieve a grandes alturas y una disminución en el coeficiente anual de escorrentía-lluvia. Respecto a la vegetación, algunas consecuencias son la reducción de la actividad fotosintética de bosques nativos y matorrales de la ecorregión mediterránea (Garreaud *et al.*, 2017), la muerte paulatina de las hojas de un gran número de árboles del bosque esclerófilo en la cuenca de Santiago (Miranda *et al.*, 2019) y un aumento en la frecuencia, intensidad y duración de incendios que se han acrecentado sustancialmente (González *et al.*, 2018).

Bambach *et al.* (2013), proyectaron un modelo para el año 2100 que muestra una disminución en el área de distribución para todas las especies del ecosistema mediterráneo, donde las áreas que presentaron una mayor reducción se encuentran a lo largo del sector costero, mientras que, para los ecosistemas nativos de la Cordillera de los Andes como las comunidades

dominadas por especies espinosas, se encontró un hábitat estable que estaría más adaptado a las proyecciones climáticas futuras. Específicamente se menciona que un modelo propuesto por Loayza *et al.* (2015), predice una reducción de aproximadamente del 60% de la distribución potencial actual para *Porlieria chilensis*, en los próximos 100 años, esto solo considerando cambios climatológicos, al agregar los cambios en el uso de suelo por los que se ve afectada la especie, esta reducción sería aún mayor.

1.2.3 Déficit hídrico, potencial hídrico y respuesta al estrés hídrico

El déficit hídrico es definido como el contenido hídrico de células o tejidos que está por debajo del contenido hídrico presentado durante el estado de hidratación (Quintanilla, 2019). Este déficit altera todos los aspectos del crecimiento de la planta involucrando la bioquímica, fisiología, anatomía y morfología. Si el déficit hídrico se extiende en el tiempo puede derivar en estrés hídrico el cual tiene impactos globales en el desarrollo de la planta, entre algunos efectos están la reducción del potencial hídrico, disminución del potencial de turgencia, la reducción del tamaño de la planta, del área de la hoja y de su rendimiento (Azcón-Bieto y Talón, 2000; Kramer, 1983; Wu *et al.*, 2001).

Específicamente el potencial hídrico, dirige el transporte por medio de las membranas celulares, es usado para medir el estado hídrico de las plantas y está determinado principalmente, por el potencial osmótico y el potencial de presión, pudiendo medirse en base a Bares (Quintanilla, 2019; Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Respecto a los mecanismos que poseen las plantas para responder frente al déficit hídrico, Donoso *et al.* (2011) menciona que para plantas de dos años de *Quillaja saponaria* (quillay) y *Cryptocarya alba* (peumo), las que fueron sometidas a restricción hídrica en el periodo estival. Una vez medidas variables hídricas y de crecimiento, se encontró que quillay no mostró un mecanismo definido de ajuste osmótico, pero si redujo su biomasa foliar y aumentó el desarrollo de raíces. Mientras que peumo, sí mostró ajuste osmótico, pero mantuvo la relación parte aérea/ parte radicular intacta. Villagra y Cavagnaro (2006) indican que para plantas de *Prosopis argentina* y *Prosopis alpataco* sometidas a condiciones de estrés hídrica, disminuyeron su biomasa total y por componentes (hojas, tallos y raíces). Por último, cambios en la distribución de la biomasa aérea y radicular como los mencionados anteriormente también se han encontrado para otras especies nativas del bosque mediterráneo del país (Donoso *et al.*, 2011; Peña-Rojas *et al.*, 2018 (a)), mientras el único estudio encontrado para guayacán y cómo responde frente a restricción hídrica se describe en el siguiente apartado.

1.3. Antecedentes de *Porlieria chilensis*

A continuación, se dan a conocer los antecedentes más relevantes de guayacán.

1.3.1 Descripción morfológica, distribución geográfica y área de presencia.

Porlieria chilensis (guayacán), es una especie endémica de Chile, corresponde a un arbusto o árbol siempre verde de hasta 5 m de altura, de copa globosa y con un tronco de hasta 20 cm

de diámetro. Se distribuye entre las regiones de Coquimbo y de O'Higgins con relevancia ecológica en sectores áridos y semiáridos, y se encuentra tanto en zonas costeras como en la Cordillera de Los Andes (Hechenleitner *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2008). El guayacán se encuentra fragmentado en subpoblaciones con una muy baja densidad debido a su sobreutilización en el pasado (MMA, 2008).

P. chilensis fue clasificada en categoría "Vulnerable" basándose principalmente en el criterio de extensión de su área de presencia, la cual fue estimada en alrededor de 8.000 km² (MMA, 2008), siendo este criterio reafirmado por Loayza *et al.*, (2015), quienes sostienen que el área de ocupación total varía entre los 320 y 1.145 km², por lo que se podría decir que la categoría se mantiene hasta la actualidad.

1.3.2 Amenazas y conservación.

Actualmente sus amenazas principales son el reemplazo de las comunidades por cultivos agrícolas, como los cultivos de palto en pendientes y la extracción selectiva. Los incendios, actividades mineras, ganadería, obras viales, entre otros solo afectarían a la especie de forma local (MMA, 2008).

Sobre su conservación en áreas silvestres, Loayza *et al.* (2015) indican que se encuentran varias subpoblaciones protegidas en cinco unidades del Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado (SNASPE), conformando en total más de 3.000 ha de formaciones vegetales con presencia de guayacán bajo protección del Estado.

1.3.3 Ecología de la especie

P. chilensis habita sobre lugares rocosos en laderas costeras en la región del Matorral y del Bosque Esclerófilo, es altamente representativo en la vegetación de *Prosopis chilensis-Schinus polygamus*, sitios donde se asocia también con otros arbustos xerofíticos como *Güetterezia resinosa*, *Proustia cuneifolia* y *P. ilicifolia* y los cactus *Echinopsis coquimbana* y *Maihueniopsis ovata*. Además, en otras localidades se relaciona con los arbustos *Acacia caven*, *Bridgesia incisifolia*, *Carica chilensis*, *Cordia decandra*, *Kageneckia oblonga* y *Lithraea caustica* (Hechenleitner *et al.*, 2005).

Según comunicación personal Vita (2020)¹, se indica que la forma de reproducción preferente de guayacán es cruzada y su forma de dispersión de semilla es por gravedad e ingesta de animales.

En sectores de distribución norte, guayacán realiza levantamiento hidráulico, es decir, transporta agua por medio de las raíces desde capas profundas y húmedas del suelo hasta las capas más superficiales, y secas (Muñoz *et al.*, 2008), esto es un elemento clave al permitir una mayor disponibilidad de humedad al individuo. Adicionalmente, permite un efecto en el microclima que tiene bajo su dosel, lo que lo vuelve más húmedo y menos caluroso que en áreas abiertas para plantas que crezcan bajo de él. (Tracól *et al.*, 2011; Molina-Montenegro *et al.*, 2020). Estas observaciones permiten afirmar que *P. chilensis* contribuye a disminuir la

¹ Antonio Vita, ingeniero forestal, Universidad de Chile.

variabilidad climática, promover el reclutamiento de otras especies y por lo tanto, actuar como especie facilitadora o nodriza en ambientes xerofíticos.

Por último, cabe mencionar que no existen antecedentes de diversidad genética o estudios de marcadores moleculares para *Porlieria chilensis*.

1.3.4. Evaluación morfofisiológica de la restricción hídrica en guayacán

A continuación, se describe los principales resultados de un estudio realizado por Quintanilla (2019), en el que se analizaron las respuestas hídricas de plantas de guayacán a la disminución del contenido de humedad relativo del sustrato (%CHRS), donde se midieron variables hídricas foliares, como el potencial hídrico a pre-alba (Ψ_a), en distintas oportunidades durante el desarrollo del ensayo, en los tratamientos de restricción hídrica controlada (TR) y control (TC). Además, se midieron parámetros derivados de curvas de presión/volumen (P/V), y otras variables como el incremento en longitud del ápice (L) y del diámetro a la altura del cuello (DAC), y la biomasa total, por componentes y la relación parte aérea/ parte subterránea (Pa/Ps) también fueron medidas.

A partir de los resultados, a nivel de tratamiento se observó que los valores de Ψ_a en TR fueron significativamente más negativos que los del TC, con diferencias significativas entre los tratamientos a partir del 50% del CHRS. Respecto a las variables utilizadas, se indica que el potencial hídrico a pre-alba (Ψ_a) presentó una alta correlación con el contenido hídrico relativo del sustrato (CHRS). Lo cual también se observó en otras especies esclerófilas chilenas bajo restricción hídrica, como fue en *Lithraea caustica* (litre) (Peña-Rojas *et al.*, 2018 (b)) y *Prosopis chilensis* (algarrobo) (Cortés, 2014) y *Acacia caven* (espino) (Donoso *et al.*, 2015), lo que confirmó al CHRS como una variable adecuada para medir el Ψ_a en especies del bosque esclerófilo.

También, se observó en los tratamientos sometidos a restricción hídrica que el Ψ_a presentó una mayor disminución cuando el CHRS alcanza valores más bajos cercanos al 40%, lo que coincidió con resultados para *Quercus ilex* (Peña-Rojas *et al.*, 2004) y espino (Donoso *et al.*, 2015) y fue similar a litre (Peña-Rojas *et al.*, 2018 (b)) y algarrobo (Cortés, 2014). Este Ψ_a siguió volviéndose más negativo con el tiempo, lo que se relacionó directamente con un CHRS cada vez más bajo, dejando en evidencia que la falta de agua imposibilita la recuperación hídrica de los individuos en la fase nocturna.

Además, se destacó que al menor CHRS (4%) el Ψ_a de guayacán llegó a su valor más bajo de -2,8 MPa, el que fue menos negativo que el registrado para algarrobo, espino y litre (Cortés, 2014; Donoso *et al.*, 2015; Peña-Rojas *et al.*, 2018 (b)). Lo anterior muestra que guayacán posee una buena capacidad para tolerar la restricción hídrica, por falta de agua en el sustrato, con uno de los valores más bajos de CHRS (4%) registrados para otras especies del bosque esclerófilo nativo y además, su Ψ_a a diferencia de otros estudios no desciende a valores muy negativos en fases de restricción hídrica severa.

Estos resultados comprueban que la restricción hídrica del sustrato afecta negativamente el estado hídrico de los individuos, obteniéndose valores de Ψ_a más negativos en TR con respecto a TC, lo que concuerda con otros estudios para especies mediterráneas que se someten a distintas categorías de riego. Los resultados que se obtuvieron para el presente estudio en guayacán que involucran la medición del Ψ se describen en el Apéndice 2.

Respecto a los parámetros derivados de curvas de presión/volumen en resumen se indica que guayacán realiza ajuste osmótico y rigidiza sus paredes celulares, en otras palabras, mantiene su turgor celular alto como mecanismo de tolerancia, siendo este su mecanismo de respuesta al estrés de entre los tres que menciona Varela (2010). Mientras, para las variables fisiológicas se indica que existieron diferencias significativas en L y DAC para los dos tratamientos, donde se obtuvieron los valores más altos de estas variables en TR en comparación con TC, esto debido a que se proporcionó en plantas de TC un riego mayor al adecuado para la especie lo que derivó en una escasez de oxígeno en el sustrato, y en las raíces lo que se reflejó en una disminución del crecimiento en L y DAC de estas plantas. Por último, para la biomasa ocurrió algo similar al L y DAC, donde el riego excesivo produjo una menor acumulación de biomasa reflejada en una pérdida de biomasa aérea en las plantas de TC, mientras para las plantas de TR hubo un mayor desarrollo e incremento de la parte radicular. Cabe destacar que el análisis realizado por Quintanilla (2019), es el único estudio que se encontró para plantas de guayacán sometidas a restricción hídrica, por ende tiene una gran importancia a la hora de comprender como responde la especie a este tratamiento en base a las diversas variables ya explicadas.

1.4. Objetivos

A continuación, se describen los objetivos de la presente memoria.

1.4.1 Objetivo general:

Analizar la diversidad y diferenciación genética de *Porlieria chilensis* I.M. Johnst. (guayacán) frente a restricción hídrica.

1.4.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la diversidad genética y diferenciación dos poblaciones en dos condiciones hídricas.
2. Caracterización de marcadores moleculares tipo SNPs de dos poblaciones frente a restricción hídrica.
3. Identificar rutas, componentes y funciones expresadas de dos poblaciones frente a restricción hídrica.

2. MATERIALES Y MÉTODO

2.1 MATERIALES

Esta memoria se desarrolló sobre el análisis de una base de datos obtenida a partir de un experimento de restricción hídrica en guayacán, posterior extracción y secuenciación de ARN (descrita en el Apéndice 3, SNPs, ya identificados y filtrados).

2.1.1 Resumen del diseño experimental para construcción de la base de datos

A continuación, se detalla el diseño experimental utilizado para construir la base de datos que es parte del material.

Tal como muestra la Figura 3, el diseño estadístico aleatorio y consistió en un experimento con 20 individuos de guayacán de dos poblaciones (diez de cada población), una en la comuna de Colina ubicada en la Región Metropolitana y otra en la comuna El Melón perteneciente a la Región de Valparaíso. Se sometió a la mitad de los individuos de cada población a condiciones de restricción hídrica, y se extrajo ARN de todos los individuos para luego ser secuenciado.

El ARN fue extraído usando el reactivo TRIzol. La calidad del ARN se determinó con un bionalizador Agilent 2100 y se secuenció en la plataforma Illumina HiSeq™2000. La preparación de las bibliotecas de ADN complementario y la secuenciación se realizó en el Laboratorio Genética INBIOGEN de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias y el Centro Productor de Semillas de Árboles Forestales, ambos pertenecientes a la Universidad de Chile.

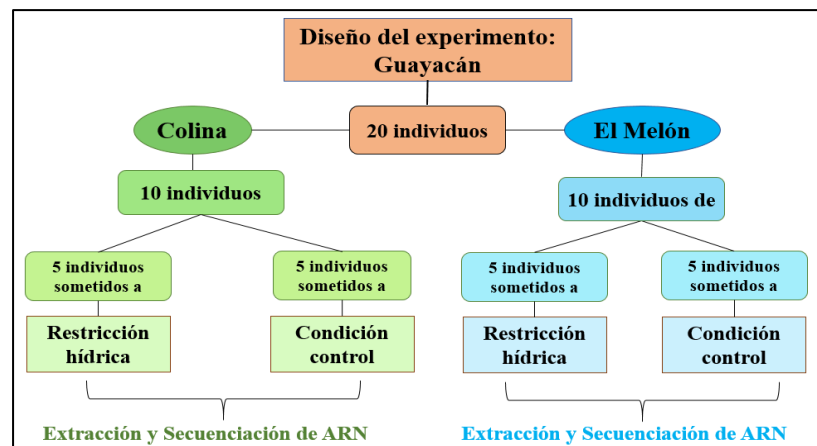


Figura 3. Diseño experimental de 20 individuos de guayacán obtenidos de la comuna de Colina y El Melón.

Para cada población se indica el número de individuos que estuvieron bajo restricción hídrica y condiciones normales de riego. A partir del experimento desarrollado para los 20 individuos

de guayacán se obtuvieron entre 9.976.917 pares de bases (pb) hasta 19.719.474 pb con un promedio de 14.054.417 pb.

En el Cuadro 2, se observa los pares de bases leídos, filtrados y no filtrados para las muestras de los cinco individuos de guayacán de Colina bajo riego normal.

Cuadro 2. Pares de bases leídas y filtradas para los cinco individuos de guayacán de Colina con riego normal (donde CO = Colina, 17 = Individuo, N = Riego Normal, Pb Leídas = Pares de bases secuenciadas de Illumina a leer, Pb Filtradas = Pares de bases filtradas, el resto de las columnas indica pares de bases que no pasaron el filtro).

Muestra	Pb leídas	Pares de bases filtradas		Solo "forward" pasan		Solo "reverse" pasan		Pares de bases erróneos	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CO 17 N	16.024.393	15.485.015	96,63	402.885	2,51	103.552	0,65	32.941	0,21
CO 40 N	12.042.992	11.568.690	96,06	374.114	3,11	66.085	0,55	34.103	0,28
CO 41 N	13.621.701	13.040.404	95,73	456.101	3,35	89.413	0,66	35.783	0,26
CO 43 N	9.976.917	9.490.311	95,12	368.792	3,7	82.027	0,82	35.787	0,36
CO 44 N	11.998.962	11.515.868	95,97	386.399	3,22	70.305	0,59	26.390	0,22

Del Cuadro 2, se puede observar que, del total de pares de bases leídas para cada muestra, la gran mayoría de estos pasaron el filtro.

2.1.2 Base de datos

Se dispuso de una base de datos, la que contiene la descripción de los SNPs expresados diferencialmente, para tres comparaciones entre las poblaciones: Colina estrés - Colina control, Colina estrés - El Melón control y El Melón estrés - El Melón control. Se detalla, además, la descripción de la molécula donde se encuentra cada SNP, su posición en los cromosomas, la función que posee y el Fold Change (medida que se explica en el punto 2.2.4). Contiene además la descripción de las secuencias para cada individuo de las dos poblaciones con y sin restricción hídrica (normal y estrés). Con esta base de datos se pudo caracterizar cada SNP en términos de que función cumple, dentro de la biología molecular de guayacán, identificando entre funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos (con mayor importancia en estos últimos); y se podrá determinar la diversidad y diferenciación genética para las poblaciones de guayacán.

La segunda parte de la base de datos que es el ensamblado de *novο* de guayacán contiene 101.228 contigs, donde el contig más largo fue de 14.322 pb. A partir de éstos, se analizaron 20.466 contigs a fin de encontrar y describir rutas metabólicas expresadas. El número de contigs según el largo (base sus pares de bases o pb), se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados ensamblaje de *novο*.

Trinity_Guayacán_ensamblado_clc N°	N°
# Contigs (>= 0 pb)	101.228
# Contigs (>= 1000 pb)	36.628
# Contigs (>= 10000 pb)	33

En el Cuadro 3 se observa que la mayoría de los contigs que se obtuvieron del ensamblaje de *novo* de guayacán tenían hasta 1.000 pb, siendo escasos los contigs que poseían un largo mayor a 10.000 pb.

2.2 MÉTODO

Desde este apartado en adelante se detalla el análisis que se realizó con la base de datos para responder a los objetivos planteados en esta memoria.

2.2.1 Procedimiento para caracterizar marcadores SNP

De los SNPs que se identificaron, se calculó a través del software Genepop versión 4.7.5 las pruebas exactas para el equilibrio de Hardy-Weinberg, diferenciación poblacional, desequilibrio genotípico entre otros (Scayle, S.A)), además se calcularon las frecuencias genéticas y genotípicas para las poblaciones estudiadas.

2.2.2 Potencial hídrico de poblaciones de guayacán según condición

Con el fin de verificar las diferencias entre las condiciones de riego se realizó una prueba estadística de Mann-Whitney-Wilcoxon, que muestra las diferencias significativas en las medias del potencial hídrico de individuos de Colina y Melón, bajo condiciones normales de riego contra aquellos que se sometieron a restricción hídrica. Se determinó usar los valores de potencial hídrico (Ψ) para esta prueba, ya que como menciona Quintanilla (2019) y Azcón-Bieto y Talón (2000), otorga una medida del estado hídrico de las plantas, el que se evalúa en conjunto con el CHRs, donde un valor alto de CHRs y un valor muy negativo de Ψ indican una menor resistencia, en cambio un CHRs bajo con valores menos negativos de Ψ significan una mayor resistencia.

2.2.3 Determinación de la diversidad y diferenciación genética

A partir de todos las frecuencias genéticas y genotípicas calculadas desde los SNP, se calcularon los valores H_o y H_e (Genepop), como medidas de diversidad genética para las poblaciones de Colina y El Melón en cada condición (control y estrés o restricción hídrica). Adicionalmente se determinó F_{st} (medida de diferenciación genética) para las diversas comparaciones entre las poblaciones en dos condiciones, tal como muestra el Cuadro 4:

Cuadro 4. Cálculo de F_{st} para las combinaciones de las dos poblaciones (Colina y El Melón) en dos condiciones.

Poblaciones	El Melón	Colina restricción hídrica	El Melón control	El Melón restricción hídrica
Colina	X			
Colina control		X	X	X
Colina estrés			X	X
El Melón control				X

Por la capacidad de procesamiento de los marcadores SNPs y la rapidez con que se obtiene la diferenciación genética entre poblaciones se optó por usar el programa Genepop para calcular el valor de *F_{st}*.

Una vez calculados estos tres parámetros genéticos (*H_o*, *H_e* y *F_{st}*), se procedió a una comparación los valores resultantes con los de otros autores, tanto con especies nativas como exóticas.

2.2.4 Identificación de rutas, componentes y funciones expresadas

A continuación se detalla el procedimiento para la descripción de rutas, componentes y funciones expresadas. En primer lugar se habla de los genes expresados diferencialmente entre poblaciones y cómo se mide la cantidad de cambio en la expresión, para después abarcar el cómo se identificaron rutas metabólicas a partir del ensamblaje de *nov* de guayacán:

A partir de la base de datos de los SNPs, para las comparaciones entre poblaciones de Colina_e vs Colina_n, Melón_n vs Colina_e y Melón_e vs Melón_n se estimó la cantidad de genes expresados diferencialmente entre ellas, distinguiendo entre genes sobre expresados y sub expresados.

Para medir que genes son sobre expresados y sub expresados se usará el Fold Change (de aquí en adelante abreviado por FC) o cambio de pliegue, que es una medida que describe cuanto cambia una cantidad entre una medición original y posterior, definiéndose como la relación entre las dos cantidades. Es usado frecuentemente en análisis de datos de expresión génica para medir el cambio en el nivel de expresión de un gen. El FC se obtuvo mediante la prueba estadística de EDGE, el cual es un paquete de software de bioconductores para examinar la expresión diferencial de datos de conteo replicados (Robinson *et al.*, 2009). Un valor negativo de FC indica que existe una sobre expresión, mientras un valor positivo muestra que hay una subexpresión de determinado gen (Tusher *et al.*, 2001). A modo de ejemplo, en el caso de Colina_e vs Colina_n si un SNP tiene un Fold Change negativo, esto significa que en la condición de Colina_n existe una sub expresión de este gen en comparación con la condición de Colina_e, mientras en el caso de ser positivo implica lo contrario.

Para el análisis de las rutas de funciones, componentes y procesos biológicos a partir del transcriptoma de *nov* de guayacán se analizaron 20.466 contigs del ensamblado total de 101.228 contigs, esto debido a la capacidad de procesamiento y rapidez con que se realizó el blasteo, el cual es una herramienta de alineamiento local que busca la similitud entre una secuencia problema y una base de datos (Parra y Ramírez, S.A), de los contigs mediante el programa BLAST2GO. En este paso se realizó un filtro en base a las taxonomías para ser más rápido y eficiente en este paso, usando los órdenes dentro de Rosidae que eran más cercanos al de la especie), las cuales después pasaron por un proceso de mapeo y de anotación (es la determinación de la estructura de los genes y de las proteínas que producen (Alvarado, 2017) en base a la ontología génica GO.

Una vez anotados los 20.466 contigs, a fin de visualizar las distintas rutas de funciones, procesos y componentes que desarrollan dentro de la biología molecular de guayacán, se

realizaron esquemas como se aprecia en la Figura 4, donde se describió para cada dominio un ejemplo de cada ruta, además de indicar cuantas secuencias se destinaron a cada término. Se esperó encontrar una mayor cantidad de procesos relacionados al estrés hídrico.

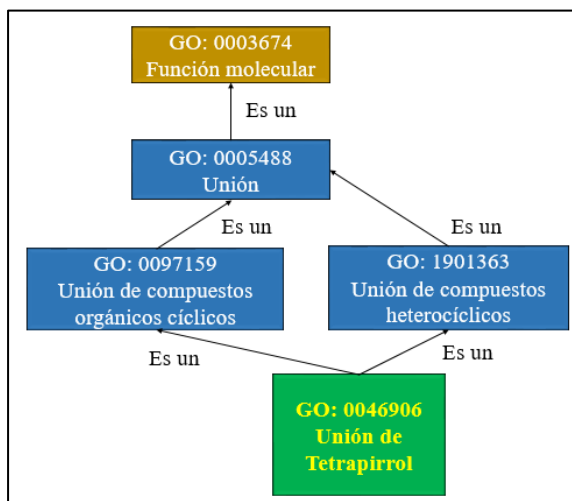


Figura 4. Ejemplo estructura para describir genes o productos génicos relacionados a rutas, componentes y funciones expresadas.

En la base del ejemplo (Figura 4), se visualiza el producto génico con el código GO: 0046906, el que puede describirse mediante la función molecular de “Unión del compuesto químico de tetrapirrol”. Para este ejemplo se puede indicar que dentro del dominio de “función molecular” se encuentra la función de “Unión”, la que a su vez se ramifica en las funciones de “Unión de compuestos orgánicos cíclicos” y de la “Unión de compuestos heterocíclicos”, dentro de los cuales está la “Unión de Tetrapirrol”. Como se dijo anteriormente, la descripción de cada término se realizó para cada dominio de la GO, donde se eligieron aquellos términos en los niveles más bajos de cada ruta que poseen alguna relación en la respuesta al estrés por restricción hídrica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Diversidad y diferenciación genética de *Porlieria chilensis*

A continuación, se presentan y analizan los valores de diversidad (H_o y H_e) y diferenciación genética de *Porlieria chilensis*, que se obtuvieron de las dos poblaciones analizadas mediante el programa Genepop.

3.1.1 Diversidad genética de *Porlieria chilensis*

La diversidad genética observada de los 2.985 marcadores SNP de las dos poblaciones analizadas en conjunto es de 0,3794, siendo muy similares las poblaciones de Colina y el Melón con 0,3792 y 0,3797 respectivamente (Cuadro 5). A continuación (Cuadros 5 y 6), se presenta los valores promedios de H_o y H_e obtenidos en cada población analizada distinguiendo entre condiciones normales de riego ($_n$) y condiciones de restricción hídrica ($_e$):

Cuadro 5. Diversidad genética observada (H_o) entre poblaciones.

POBLACIÓN	VALOR
Colina_n	0,4221
Colina_e	0,3362
Melón_n	0,4040
Melón_e	0,3554
Colina promedio	0,3792
Melón promedio	0,3797
Promedio	0,3794

Cuadro 6. Diversidad genética esperada (H_e) entre poblaciones.

POBLACIÓN	VALOR
Colina_n	0,2951
Colina_e	0,2402
Melón_n	0,2874
Melón_e	0,2691
Colina promedio	0,2734
Melón promedio	0,2800
Promedio	0,2747

A nivel de condición (normal y restricción hídrica) se observa una diferencia en H_o , donde para cada localidad los valores más altos de H_o se obtienen en condiciones de riego normal, Colina_n y Melón_n, 0,42221 y 0,4040 respectivamente, en comparación con condiciones de restricción hídrica, de las mismas localidades Colina_e y Melón_e, de 0,3362 y 0,3554 respectivamente (Cuadro 5). Lo anterior indicaría una diferencia en la expresión de la

diversidad genética en términos de H_o entre condiciones de restricción hídrica y riego normal para las dos poblaciones analizadas.

Por otra parte, la H_e de los 2.985 marcadores SNP de las dos poblaciones analizadas en conjunto es de 0,2747 (Cuadro 6). Hamrick *et al.*, (1992), indican que a partir de una revisión de estudios con aloenzimas la H_e , entre poblaciones de especies arbóreas perennes de larga vida es de 0,177 y aquellas pertenecientes a las Angiospermas es de 0,183. En este mismo estudio para especies leñosas de distribución geográfica restringida indica que la diversidad entre poblaciones es de 0,165, valores más bajos que los obtenidos para guayacán. Además, *P. chilensis* supera los valores de H_e de especies de zonas templadas que es de 0,166 (Hamrick *et al.*, 1992). Por otra parte, especies de reproducción sexual y asexual, o de dispersión por ingesta de semillas o frutos también poseen en promedio una diversidad genética menor (H_e de 0,251 y 0,231 respectivamente), comparadas con guayacán. El valor para guayacán es alto pues, según Hamrick y Godt (1996), en una revisión de estudios con aloenzimas para especies de la familia de las Fabaceae (perteneciente al grupo de las Fabidas el mismo de guayacán), muestran que la H_e es de 0,184. Hamrick y Godt (1996), muestran que para especies que se reproducen de forma cruzada, y que poseen dispersión de semilla por gravedad o ingesta de animales tienen una H_e de 0,179. Por último, aquellas que se reproducen de forma cruzada y con una distribución geográfica restringida tienen una H_e de 0,155.

La comparación entre localidades (Melón y Colina) no muestra una diferencia clara en la H_e , con valores similares, de 0,2800 y 0,2734 respectivamente (Cuadro 6). Estos valores al igual que para el promedio de las poblaciones son igual de altos comparándolos con otras especies de Angiospermas, de distribución geográfica restringida, de zonas templadas, de reproducción cruzada o de dispersión por gravedad o ingesta (Hamrick *et al.*, 1992 y Hamrick y Godt 1996). Todo esto sugiere que *Porlieria chilensis* estaría por encima de los valores promedios de diversidad genética en términos de H_e que se dan para otras especies y dentro de diversas categorías de ellas, indicando una riqueza en la diversidad de los genes que existen en sus poblaciones naturales.

A nivel de condición (normal y restricción hídrica) hay una diferencia en la H_e entre las dos poblaciones, donde para cada localidad los valores más altos de H_e se obtienen en condiciones de riego normal, Colina_n y Melón_n, 0,2951 y 0,2874 respectivamente, en comparación con condiciones de estrés hídrico, de las mismas localidades Colina_e y Melón_e, de 0,2402 y 0,2691 respectivamente (Cuadro 6). Lo anterior indicaría una diferencia en la expresión de la diversidad genética en términos de H_e entre condiciones de restricción hídrica y riego normal para las dos poblaciones analizadas.

Comparando los resultados obtenidos con especies nativas del bosque esclerófilo y espinoso con las que comparte ambiente, en el caso de *Prosopis chilensis*, *Quillaja saponaria* y *Beilschmiedia miersii* todos presentaron valores más altos tanto de H_o como H_e que guayacán (Chequer *et al.* 2020; Letelier *et al.* 2015; Montenegro *et al.* 2010). Las cactáceas del género *Eriosyce* -una de ellas *Eriosyce chilensis* que actualmente está en peligro de extinción- poseen una H_e mayor a la que se obtuvo para las poblaciones de guayacán (Cuadro 1) (Tamburrino, 2018). Por otra parte, se observó que la H_e y H_o promedio de las poblaciones de guayacán de Colina y el Melón, fueron mayores que para la mayoría de las especies del

género *Nothofagus* que se analizaron, siendo *Nothofagus obliqua* la única con valores más altos que los que se obtuvieron en este estudio (Cuadro 1). Por último, para especies del sur de Chile y Argentina, como *Aextoxicon punctatum* presentó valores más altos de H_o y H_e , mientras *Austrocedrus chilensis* tuvo valores más bajos para estos dos parámetros (Cuadro 1). En resumen, guayacán presentó diferencias en sus valores de H_o y H_e al compararlos con los de otras especies leñosas presentes en Chile.

Para la especie *Theobroma cacao* L., especie que tras el mapeo de secuencias se identificó con una gran cantidad moléculas descritas las permitieron caracterizar a guayacán (Figura 5), se determinó mediante marcadores SNP un H_o y H_e de 0,206 y 0,367 respectivamente, en este caso guayacán posee una mayor H_o pero una menor H_e (Ji *et al.*, 2012), por lo que no puede indicarse si la diversidad genética de guayacán es mayor o menor al compararla con esta especie que es genéticamente cercana a ella.

Por último, para especies comerciales como *Populus trichocarpa* (Torr & A. Gray) se determinó un H_o usando marcadores SNP, con un valor más alto del que se obtuvo con guayacán (Porth y El-Kassaby, 2014). Adicionalmente, y comparando con especies cultivadas, *Porlieria chilensis* posee una diversidad mayor en términos de H_o respecto a *Pinus greggii*, pero menor en comparación a *Eucalyptus cladocalyx* (Parraguire *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2016), por lo que no es posible afirmar que guayacán posea una diversidad genética mayor a la de estas tres especies exóticas.

A continuación, se detalla los resultados de diferenciación genética en base al parámetro de F_{st} .

3.1.2 Diferenciación genética de *Porlieria chilensis*

A partir de los 2.985 marcadores SNP se obtuvo una baja diferenciación genética (Cuadro 7), de las dos poblaciones analizadas en conjunto (Colina vs Melón), con un valor de F_{st} igual a 0,0069. Esto indica que a nivel de localidades no hay estructuración genética. Hamrick y Godt (1996), indican en un estudio con aloenzimas que para poblaciones de especies de la familia de las Fabaceae (perteneciente al grupo de las Fabidas al igual que guayacán), la diferenciación genética medida con el parámetro G_{st} (medida comparable al F_{st}) es de 0,277, lo que sugiere que las poblaciones de guayacán están por debajo del promedio de esta familia. Hamrick y Godt (1996), muestran que para especies que se reproducen de forma cruzada y que poseen dispersión de semilla por gravedad o ingesta tienen un G_{st} de 0,162, también aquellas que se reproducen de forma cruzada y con una distribución geográfica restringida tiene un valor de G_{st} de 0,169. Todos estos valores son mayores que los que se tuvo para guayacán (Cuadro 7), por lo que se puede afirmar que para el promedio de especies que comparten estos rasgos con guayacán, la diferenciación genética de sus poblaciones es mayor existiendo estructuración genética para ellas, pero no para las poblaciones de guayacán estudiadas.

Hamrick *et al.* (1992), indican que a partir de un estudio con aloenzimas G_{st} entre poblaciones de especies arbóreas perennes de larga duración es de 0,084 y aquellas pertenecientes a las Angiospermas es de un de 0,102. En este mismo estudio para especies leñosas de distribución geográfica restringida la diferenciación entre poblaciones es de un

0,124, un valor más alto del que se obtuvo para guayacán (Cuadro 7). Además, *P. chilensis* posee una menor F_{st} que el promedio de especies de zonas templadas cuyo G_{st} es de 0,092. Especies con otros atributos como de reproducción cruzada o de dispersión por ingesta también poseen en promedio una diferenciación genética mayor ($G_{st} = 0,051$), comparadas con guayacán. Todo esto sugiere que *Porlieria chilensis* estaría por debajo de los valores promedios que se dan para otras especies y dentro de diversas categorías de ellas, indicando que comparte una gran cantidad de los genes que existen en sus poblaciones con una nula o escasa estructuración genética.

A continuación (Cuadro 7), se presenta los valores de diferenciación genética (F_{st}), obtenidos en cada población analizada, distinguiendo entre condiciones normales de riego (_n) y condiciones de restricción hídrica o estrés (_e):

Cuadro 7. Diferenciación genética (F_{st}) entre poblaciones.

Población	Valor
Todas juntas	0,0566
Colina vs Melón	0,0069
Colina_n vs Colina_e	0,0890
Colina_n vs Melón_n	0,0267
Colina_n vs Melón_e	0,0620
Colina_e vs Melón_n	0,0914
Colina_e vs Melón_e	0,0093
Melón_n vs Melón_e	0,0566

La comparación entre condiciones para las dos poblaciones, Colina_n vs Colina_e y Melón_n vs Melón_e, resultaron en una diferenciación genética moderada, 0,0890 y 0,0566 respectivamente, existiendo una diferenciación genética significativa al comparar condiciones diferentes, por lo que a nivel de condición existe estructuración genética. Mientras que para aquellas similares, Colina_n vs Melón_n y Colina_e vs Melón_e, se dan valores pequeños de diferenciación, 0,0267 y 0,0093 respectivamente, por lo que no es posible afirmar que exista estructuración genética a este nivel de análisis (Cuadro 7).

Comparando la diferenciación genética de guayacán con valores para especies nativas (Cuadro 7), se observó que la diferenciación genética de las poblaciones de guayacán de Colina y el Melón ($F_{st} = 0,0069$) fue menor que para la totalidad de especies del género *Nothofagus* que se analizaron. Continuando con especies del Bosque Esclerófilo, para *Prosopis chilensis*, *Quillaja saponaria* y *Beilschmiedia miersii* (Chequer *et al.*, 2020; Letelier *et al.*, 2015; Montenegro *et al.*, 2010), estas tres presentaron valores más altos de diferenciación genética que para las poblaciones de guayacán. En especies endémicas del sur de Chile y Argentina, *Aextoxicon punctatum* y *Austrocedrus chilensis* presentaron valores más altos de F_{st} (Cuadro 1). Por último, cactáceas del género *Eriosyce* (Tamburrino, 2018) poseen una diferenciación genética mayor (donde tres de las cuatro especies analizadas tienen

un F_{st} mayor a 0,1) a la que se obtuvo para las dos poblaciones de guayacán. En general, dada la poca diferenciación ($F_{st} < 0,05$) que se obtuvo entre Colina y Melón (Cuadro 7), se indica que no existe un grado de estructuración genética a diferencia de otras especies nativas del país.

Mora *et al.* (2016), indican en un estudio con microsatélites de *Eucalyptus cladocalyx* (F. Muell.) que la diferenciación genética fue de un F_{st} de 0,086. Por último, Parraguirre *et al.* (2002) muestra que para poblaciones naturales de *Pinus greggii* en base a loci isoenzimáticos la diferenciación genética fue moderada con un valor de F_{st} de 0,379. Por lo tanto, *Porlieria chilensis* mostró una diferenciación genética de sus poblaciones menor respecto a estas dos especies analizadas.

3.2. Caracterización de marcadores moleculares tipo SNPs.

En el siguiente apartado se expone una descripción de los marcadores moleculares filtrados tipo SNPs expresados diferencialmente, los cuales fueron entregados en la base de datos, además de los tres dominios de la ontología génica (función molecular, componente celular y proceso biológico) que se obtuvieron de la anotación de los 20.466 contigs. En primer lugar, se da una revisión a los resultados preliminares de la anotación de genes de los 20.466 contigs, luego el número de marcadores moleculares SNPs que se encontraron bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, el análisis de SNPs expresados diferencialmente y finalmente las rutas, componentes y funciones expresadas.

3.2.1 Anotación de genes

A continuación, se describe los resultados del blasteo, mapeo y anotación de los 20.466 contigs del transcriptoma de *novo* de guayacán:

BLAST. De 20.466 contigs, 19.855 (97,01%) se convirtieron en secuencias de proteínas conocidas en la base de datos de proteínas “nr” (Cuadro 8), mientras que 611 (2,99%) contigs no encontraron ningún resultado mediante la configuración BLASTX establecida. Hay varias razones para la falta de homología con proteínas conocidas, entre las razones biológicas se encuentran la escasez de secuencias de proteínas anotadas de especies filogenéticamente cercanas a *Porlieria chilensis* en la base de datos, secuencias de regiones no traducidas (UTR) de ARNm, ARN no codificante largo o proteínas huérfanas. También, otras posibles causas pueden ser problemas técnicos en la secuenciación y artefactos de ensamblaje. El total de contigs que fueron mapeados y anotados, además de los contigs que no tuvieron Blast Hits, se detalla en el Cuadro 8.

Mapeo. Había 17.727 contigs (86,62%) que se pudieron mapear en términos GO, mientras que 2.739 (13,38%) contigs (Cuadro 8) no se pudieron mapear en términos GO. Esta deficiencia puede indicar la limitación de la base de datos de proteínas NCBI nr, por no tener una extensa anotación.

Anotación. Hubo 2.015 contigs (Cuadro 8) de los que se obtuvieron un resultado de mapeo pero no se recuperó un término GO. Lo anterior puede ser consecuencia de códigos de

evidencia de baja confiabilidad o una cobertura de baja similitud entre la consulta y los resultados y, por ende, no cruzaron el valor de umbral de anotación. La anotación basada en la homología asignó funciones genéticas a 15.712 contigs. Para la obtención de un esquema de la anotación del transcriptoma, se representó tres categorías de términos de GO (Figuras 10, 12 y 14) en el nivel dos del grafico acíclico directo de GO.

Cuadro 8. Resumen de los resultados de búsqueda, mapeo y anotación de homología blast del transcriptoma de *P. chilensis* expresado diferencialmente bajo restricción hídrica.

Tipo	Número de contigs
Sin Blast Hits	611
Sin mapeo	2.739
Con mapeo y sin Anotación	2.015
Secuencias anotadas de BLASTX	15.712
Total de contigs	20.466

En la Figura 5, se presenta la distribución de especies por Top-Hits o sea, aquellas especies cuyos genes coincidían mayoritariamente con los de guayacán.

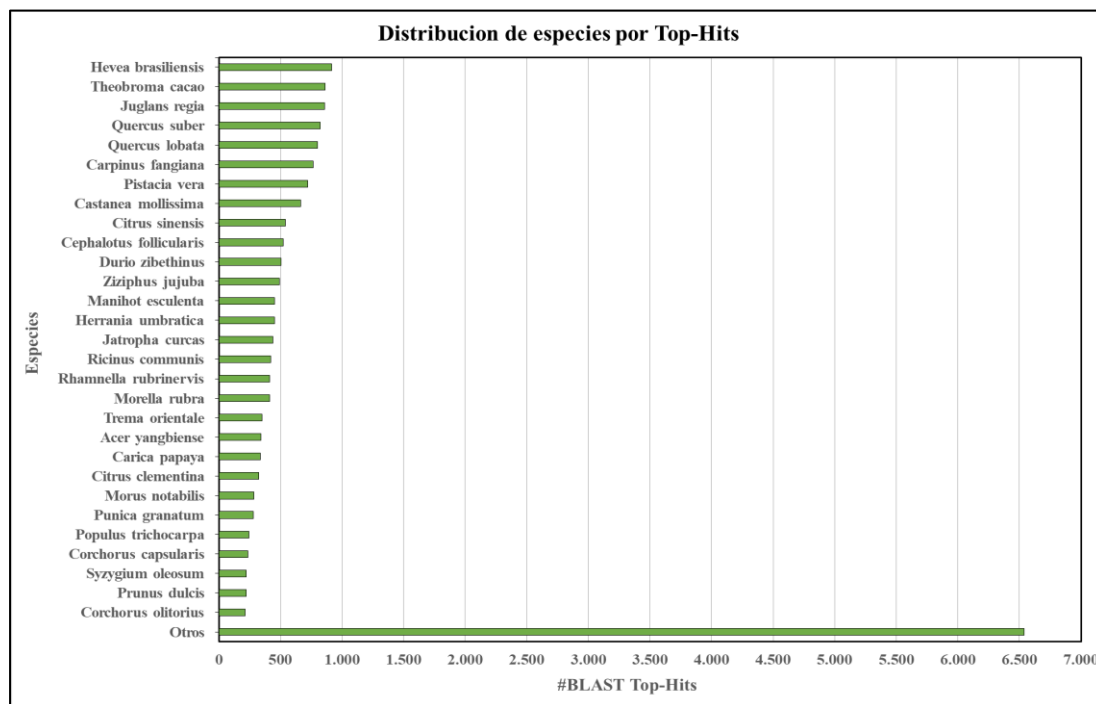


Figura 5. Distribución de especies de los mejores resultados de BLAST para todas las secuencias homólogas.

La distribución de especies de impacto superior mostró que en su mayoría los genes coincidían con *Hevea brasiliensis*, que corresponde al orden de las Malpighiales

perteneciente al clado de las Fabidas al igual que *P. chilensis*. La segunda especie que coincidía con la mayoría de los genes *Theobroma cacao* pertenece al orden de las Malvales perteneciente al clado de las Málvidas. Continuando, el tercer y cuarto lugar lo ocupan *Juglans regia* y *Quercus suber*, las que corresponden al orden de las Fagales, pertenecientes al clado de las Fabidas. Dentro de las primeras 30 especies no se encontró ninguna que corresponda al orden de *P. chilensis* (Zygophyllales) dada la escasa información de secuencias de proteínas anotadas de especies filogenéticamente cercanas a ella, lo que demuestra los pocos estudios que existen acerca de especies relativas a guayacán.

3.2.2 Marcadores moleculares SNPs

A continuación (Cuadro 9), se indican el número de marcadores moleculares SNPs que se encontraron bajo equilibrio de Hardy-Weinberg:

Cuadro 9. Número de SNPs bajo equilibrio de Hardy-Weinberg.

	Bajo equilibrio Hardy-Weinberg	No Bajo equilibrio Hardy-Weinberg	Total
Número de SNPs	2.334	651	2.985
% SNP	78%	22%	

De los 2.985 SNPs, se encontró que la gran mayoría (78%) de estos están bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras solo un 22% están fuera de este equilibrio, de manera que las fuerzas evolutivas como deriva génica, selección y migración actúan sobre ellos (Cuadro 9).

3.2.3 Análisis de SNPs expresados diferencialmente

En el Cuadro 10, se indican el número de marcadores moleculares SNPs que se comparten en cada comparación, como así el total:

Cuadro 10. Número de marcadores SNPs en común entre comparaciones y sus respectivos totales.

	Colina_e vs Colina_n	Melón_n vs Colina_e	Melón_e vs Melón_n
SNPs en común	135	142	104
Total SNPs	166	153	118
% SNPs en común / Total	81%	93%	88%
Total de SNPs	200		

Del Cuadro 10, se observa que hay más de un 80% de SNPs que comparten en común las tres comparaciones realizadas, además el total de SNPs que se expresaron diferencialmente para las tres comparaciones fue de 200, lo que indica la gran similitud que tuvieron los SNPs resultantes.

A continuación (Figura 6), se presentan los seis términos GO que se repitieron más veces para cada dominio de la ontología génica de los 166 SNPs expresados diferencialmente en

Colina_e vs Colina_n, cada uno con su respectivo ID y descripción. En primer lugar, se indican aquellos términos relacionados a funciones moleculares.

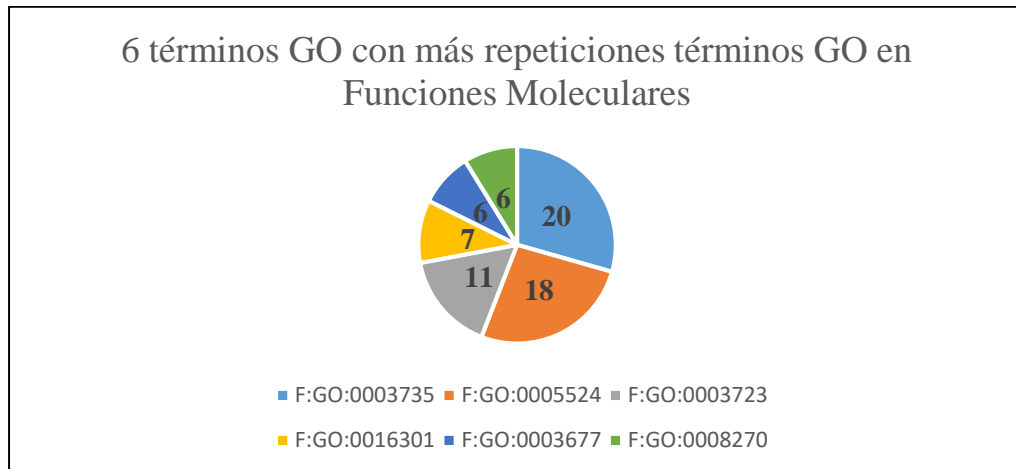


Figura 6. Seis términos GO presentes en SNPs con mayor número de repeticiones correspondientes a funciones moleculares.

El término con mayor número de repeticiones GO: 0003735, corresponde a un “Constituyente estructural de ribosoma”; el segundo GO: 0005524, corresponde a “Unión de ATP”; el tercero GO: 0003723, corresponde a “Unión de ARN”; el cuarto GO: 0016301, corresponde a “Actividad de quinasas”; el quinto GO: 0003677, corresponde a “Unión de ADN” y el sexto GO: 0008270, corresponde a “Unión de iones de Zinc” (Figura 6).

Se encontró que de estos seis términos expresados en mayor cantidad en guayacán para funciones moleculares, ha sido documentados con resultados similares, donde los términos GO: 0003735, 0005524, 0016301, 0003677 y 0008270 aparecieron expresados diferencialmente para otras especies que se sometieron a estrés hídrico (Liang *et al.*, 2017; Stolf-Moreira *et al.*, 2011), lo que permite corroborar que estos términos poseen una expresión diferencial bajo condiciones de restricción hídrica para la biología de guayacán.

Continuando, se indican aquellos términos relacionados a componentes celulares (Figura 7).

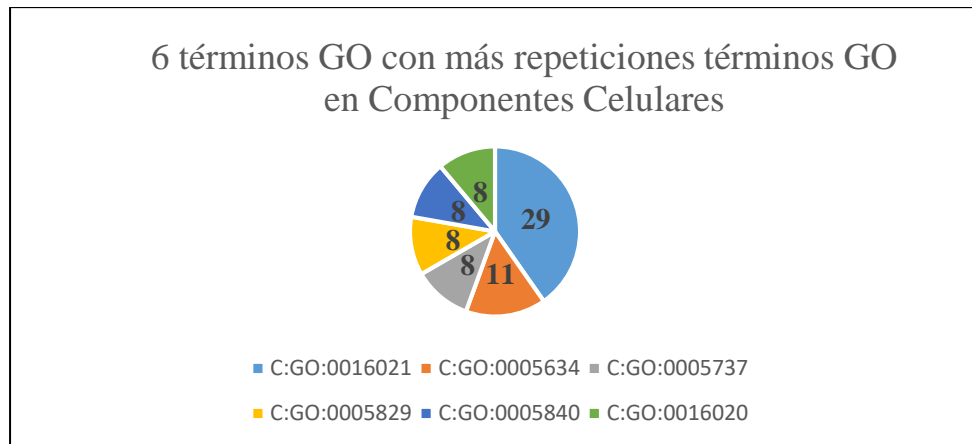


Figura 7. Seis términos GO presentes en SNPs con mayor número de repeticiones correspondientes a componentes celulares.

El término con mayor número de repeticiones GO: 00016021, corresponde a un “Componente integral de membrana”; el segundo GO: 0005634, corresponde a “Núcleo”; el tercero GO: 0005737, corresponde a “Citoplasma”; el cuarto GO: 0005829, corresponde a “Citosol”; el quinto GO: 0005840, corresponde a “Ribosoma” y el sexto GO: 0016020, corresponde a “Membrana” (Figura 7).

Se encontró que, de estos seis términos expresados en mayor cantidad para componentes celulares, han sido documentados con resultados similares donde el término: GO: 0005840, y 0016020 aparecieron expresados diferencialmente para otras especies que se sometieron a estrés hídrico (Liang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019), lo que permite corroborar que estos términos poseen una expresión diferencial bajo condiciones de restricción hídrica para la biología de guayacán.

Por último, se indican aquellos términos relacionados a procesos biológicos (Figura 8).

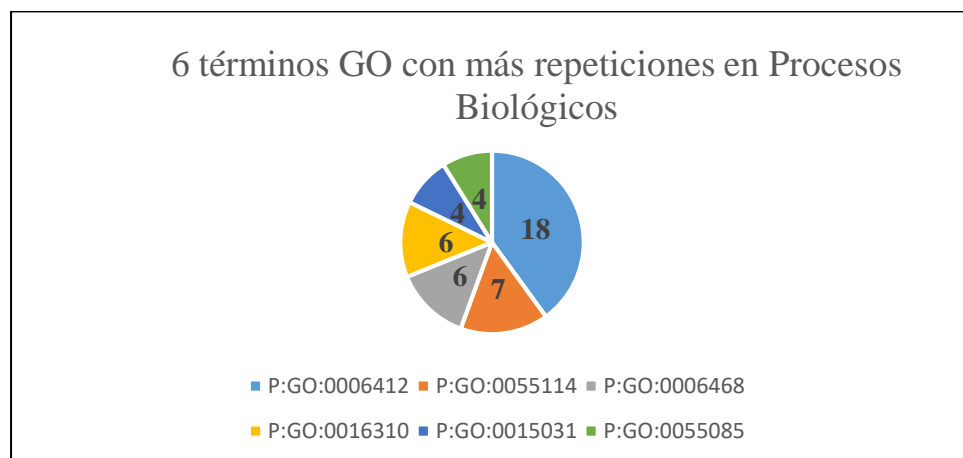


Figura 8. Seis términos GO presentes en SNPs con mayor número de repeticiones correspondientes a procesos biológicos.

El término con mayor número de repeticiones GO: 0006412, corresponde a un “Traducción”; el segundo GO: 0005114, corresponde a “Proceso de oxidación-reducción”; el tercero GO:

0006468, corresponde a “Fosforilación de proteínas”; el cuarto GO: 0016310, corresponde a “Fosforilación”; el quinto GO: 0015031, corresponde a “Transporte de proteínas” y el sexto GO: 0055085, corresponde a “Transporte transmembrana” (Figura 8).

Se encontró que de estos seis términos expresados en mayor cantidad en guayacán para procesos biológicos (Figura 8), han sido documentados con resultados similares, donde los términos GO: 0006412, 0005114 y 0016310 aparecieron expresados diferencialmente para otras especies que se sometieron a estrés hídrico (Liang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018; Stolf-Moreira *et al.*, 2011), lo que permite corroborar que estos términos poseen una expresión diferencial bajo condiciones de restricción hídrica para la biología de guayacán.

Además, dentro de los procesos biológicos se encontraron los siguientes términos que guardan relación con la respuesta frente al estrés por calor:

P: GO: 0061408, que corresponde a “Regulación positiva de la transcripción del promotor del ARN polimerasa II en respuesta al estrés por calor”.

P: GO: 0034605, que corresponde a “Respuesta celular al calor”.

P: GO: 0009414, que corresponde a “Respuesta a la privación de agua”.

P: GO: 0006833, que corresponde a “Transporte de agua”.

A continuación (Cuadro 11), se indica el número de marcadores moleculares SNPs que se sobre y sub expresaron diferencialmente para la comparación de Colina_e vs Colina_n:

Cuadro 11. Número de SNPs sobre y sub expresados para Colina_e vs Colina_n.

	Colina_e vs Colina_n	Total
SNPs sobre expresados	82	166
SNPs sub expresados	84	

Respecto a la cantidad de genes expresados diferencialmente (Cuadro 11), de los 166 SNPs expresados para Colina_e vs Colina_n, 82 de ellos se sobre expresaron en la condición de Colina_e en comparación a Colina_n (FC negativo) y 84 se encontraron sub expresados (FC positivo), por lo que se puede decir que para este estudio se obtuvieron más genes con una sub expresión bajo condiciones de restricción hídrica en comparación con un riego normal.

En resumen, de los productos de genes inducibles por estrés por sequía que indicó Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (2007), se encontraron los siguientes términos GO correspondientes a: Canales de agua, enzimas detoxificantes, factores de protección de macromoléculas (chaperonas), proteasas, factores de transcripción de estrés por calor, proteínas quinasas, fosfatasa y proteínas de unión a ARNm.

A continuación (Cuadro 12), se hace una descripción de los términos GO pertenecientes a procesos biológicos que se obtuvieron del análisis de expresión diferencial para la comparación de Colina_e vs Colina_n y su rol en la respuesta al estrés por calor o sequía, se indica además el número de SNPs bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y se menciona su

ubicación dentro del “cromosoma”. Se incluyen además algunos que fueron mencionados por Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (2007).

Cuadro 12. Términos GO involucrados en la respuesta a la sequía.

GO ID (SNP_cromosoma)	Descripción (Autor)	Fold change
P: GO: 0006412 Traducción (SNP_36.099)	La modificación postraduccional de proteínas desempeña un rol clave en la respuesta al estrés por sequía. (Bhargava y Sawant, 2013). 1/1 SNPs bajo equilibrio HW.	-2,23
P: GO: 0055114 Proceso de óxido-reducción (SNP_32.557)	Las mitocondrias poseen un rol importante en establecer el estado redox celular y en dar inicio a las cascadas de transducción de señales bajo estrés por sequía. El estrés por sequía induce un cambio importante en el estado redox celular debido a una mayor producción de ROS (Cruz de Carvalho, 2008). 2/2 SNPs bajo equilibrio HW.	-26,2
P: GO: 0006468 Fosforilación de proteínas (SNP_6.810)	En las plantas, la fosforilación de proteínas se relaciona con respuestas a la luz y el estrés por temperatura. Se han identificado proteínas fosforiladas envueltas en el empalme del ARN, el control transcripcional, la protección/ defensa del estrés y percepción y señalización del estrés que podrían guardar relación con la tolerancia al calor mejorada (Zhang <i>et al.</i> , 2020). 8/8 SNPs bajo equilibrio HW.	-2,33
P: GO: 0016310 Fosforilación (SNP_6.810)	En plantas, la fosforilación es de vital importancia en varios procesos fisiológicos, donde se incluyen la señalización hormonal y respuesta al estrés por sequía. 6/6 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 29.340. (Dai Vu <i>et al.</i> , 2016)	-2,33
P: GO: 0055085 Transporte transmembrana (SNP_9.528)	Los sistemas de transporte de membrana vegetales poseen un rol clave en la adaptación por escasez de agua. Según las necesidades energéticas, la translocación por medio de membranas se hace de manera activa o pasiva. El transporte activo se hace por medio de transportadores primarios y secundarios, que usan la hidrólisis de ATP y gradientes de iones, respectivamente, para impulsar solutos a través de las membranas. Mientras, el transporte pasivo, se realiza mediante canales y portadores (Jarzyniak y Jasinki 2014). 14/14 SNPs bajo equilibrio HW.	3,36
P: GO: 0061408 Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	Estudios indican un mecanismo de represión transcripcional por un ARN pequeño y sugieren que el ARN B2 se asocia con Pol II en promotores en células sometidas choque térmico inhibiendo activamente la transcripción (Espinoza <i>et al.</i> , 2004).	-4,51

en respuesta al estrés por calor (SNP_32.144)	1/1 SNPs bajo equilibrio HW.	
P: GO: 0009414 Respuesta a la privación de agua (SNP_36.099)	Se indicó como un término GO que se expresa diferencialmente bajo condiciones de estrés por sequía (Wu <i>et al.</i> , 2018). 2/2 SNPs bajo equilibrio HW.	2,39
P: GO: 0006833 Transporte de agua (SNP_35.581)	En las plantas, la regulación del transporte de agua y la fotosíntesis tienen un rol clave en mejorar la tolerancia a la sequía (Ding <i>et al.</i> , 2018). 2/2 SNPs bajo equilibrio HW.	2,39
P:GO:0051085 Refundición de proteínas dependiente del cofactor de la chaperona (SNP_11.631)	Es conocido que las chaperonas se expresan en respuesta a condiciones de estrés ambiental como calor, frío y sequía, entre otros (Wang <i>et al.</i> , 2004) 4/4 SNPs bajo equilibrio HW.	3,47

A partir del Cuadro 12, se observa que la mayoría de los términos GO descritos aquí poseen una sobreexpresión en restricción hídrica en comparación con riego normal. De los cuales, el término GO: 0005114 se encontró que existe concordancia con lo descrito con Wu *t al.* (2015), que la identifica como un producto génico que aumenta su expresión bajo condiciones de estrés hídrico. Respecto a aquellos términos GO que se sub expresaron se observó que la expresión diferencial de GO: 0051085 difiere de lo descrito por Xiong *et al.* (2017), quienes indican que un gen de la especie *Fagopyrum esculentum*, actúa como proteína de chaperona que ayuda a combatir el estrés por sequía, el cual mostró una sobre expresión, en cambio en lo obtenido para este estudio se indica que se sub expresa en estas condiciones. Esta discordancia puede deberse a una diferencia en los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico entre las dos especies analizadas, donde ciertos productos génicos se sobre o sub expresaran de forma diferente.

Respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, para estos términos GO, la totalidad de los SNPs a los que se asocian están bajo equilibrio, lo que indica que no están sometidas a fuerzas micro evolutivas.

En el Apéndice 4, se encuentran otros términos GO (que incluyen Funciones, componentes y procesos biológicos) con una posible implicancia en la respuesta a la sequía, a los cuales se les hace una breve descripción, se indica el número de SNPs bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y se menciona su ubicación dentro del “cromosoma”. De estos términos, cabe resaltar que parte de los SNPs asociados a ellos no se encontraron bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, en este caso se puede afirmar que las fuerzas evolutivas están actuando.

3.3 Rutas, componentes y funciones expresadas

En la Figura 9, se presentan las rutas de funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos que se obtuvieron mediante el blasteo, mapeo y anotación de los 20.466

contigs del transcriptoma de guayacán. Debido a la extensión y para simplificar su interpretación, se describe brevemente para cada dominio una ruta de cierto producto génico con su respectivo ID, la descripción que se entrega fue obtenida mediante el mismo programa BLAST2GO. Las rutas completas están disponibles en el Apéndice 5. En primer lugar, se describe una ruta metabólica correspondiente al dominio de “función molecular”.

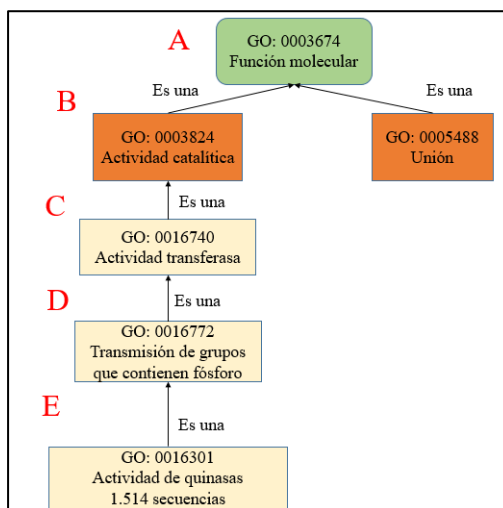


Figura 9. Ruta de funciones moleculares.

Un ejemplo de ruta metabólica del dominio de funciones moleculares que se detalla para guayacán es la “Actividad de quinasas”, la cual se describe en cascada siguiendo las letras en rojo (de A a E). Los colores de cada celda indican el número de secuencias que se destinan para cada producto génico en el siguiente orden de menor a mayor: Amarillo claro, naranja y verde (Figura 9).

En primer lugar, una “función molecular” es un proceso molecular que pueden ser llevado a cabo por acción de una sola maquina macromolecular, usualmente por medio de interacciones físicas con otras entidades moleculares; la cual se subdivide en la “Unión”, que es la interacción selectiva de una molécula con uno o más sitios específicos u otra molécula y también en la “Actividad catalítica”, que se detalla como la catálisis de una reacción bioquímica a temperaturas fisiológicas donde sustratos y enzimas interactúan; una clase de esta actividad es la “Actividad transferasa”, que se entiende como la catálisis de la transferencia de un grupo (metilo, glicosilo, acilo, conteniente de fosforo, entre otros) de un compuesto a otro; la cual se clasifica en una “Transmisión de grupos que contienen fósforo”, que es la catálisis de la transferencia de un grupo que contiene fósforo de un compuesto a otro; y dentro de esta última función se encuentra la “Actividad de quinasas”, que se define como la catálisis de la transferencia de un grupo fosfato usualmente de ATP a una molécula de sustrato.

El término “Activida de quinasas” presentó un total de 1.514 secuencias que se asociaron con esta clase de función (Figura 9). Además, como se describió anteriormente, las quinasas son un producto de genes inducibles por sequía en *Arabidopsis* perteneciente al grupo de proteínas reguladoras relacionadas en la regulación adicional de la transducción de señales y la expresión sensible al estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Otros autores

conciden en que las proteínas quinasas tienen importancia en las vías de transducción de señales, y en un estudio con maíz se indica que pueden ocupar un rol en la respuesta al estrés por sequía (Stone y Walker, 1995; Laurie, y Halford, 2001). Debido a lo anterior, es posible decir que este producto génico expresado en guayacán podría jugar un papel importante en la respuesta al estrés por sequía para la especie.

La Figura 10 muestra en detalle el total de secuencias que se destinan para cada función molecular, las cuales agrupan otras y por ende poseen usualmente un mayor número de secuencias que aquellas funciones que se ramifican más hacia abajo, esto permite entender mejor como se distribuyen las secuencias para cada función dentro de este dominio de la ontología génica.

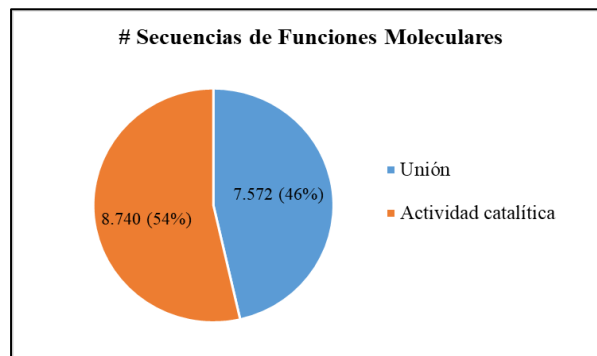


Figura 10. # Secuencias de funciones moleculares.

A modo global, respecto a la cantidad de secuencias que se derivan para cada término dentro del dominio de funciones moleculares, de las 16.312 secuencias anotadas, un 54% de ellas corresponden a “Actividad catalítica” y un 46% a “Unión” (Figura 10). Lo anterior indica que al nivel del dominio de funciones moleculares, son solo dos, los procesos para los cuales decodifican la mayoría de las secuencias de ADN expresado, cabe recordar que como se analizaron 20.466 contigs del total de 100.000 contigs del ensamblaje del transcriptoma de guayacán, pueden que hayan otras funciones que no se vieron en estos resultados que son parte de esta ruta metabólica.

Continuando (Figura 11), se describe una ruta metabólica correspondiente al dominio de “Componente Celular”.

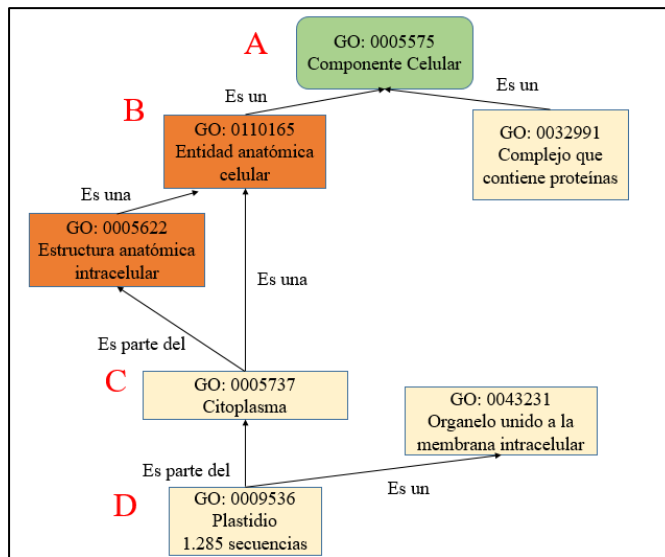


Figura 11. Ruta de componentes celulares.

Un ejemplo de ruta metabólica del dominio de componentes celulares que se describe para guayacán es el “Plastidio”, el cual se describe en cascada siguiendo las letras en rojo (de A a D).

En primer lugar, un “Componente Celular” se define como una ubicación relativa a compartimentos y estructuras celulares, ocupadas por una maquina macromolecular cuando lleva a cabo una función molecular; el cual se subdivide en un “Complejo que contiene proteínas”, que es un ensamble de dos o más macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, entre otros) en el cual al menos un componente es una proteína y las partes constituyentes funcionan juntas, y también en una “Entidad anatómica celular”, que se entiende como una sustancia producida con granularidad por encima del nivel de un complejo proteico; la cual a su vez se subdivide en una “Estructura anatómica intracelular” y en el “Citoplasma”, que son todos los contenidos de una célula excluyendo la membrana de plasma, pero que incluye otras estructuras sub celulares; y del cual es parte el “Plastidio”, que se define como un miembro de la familia de organelos de plantas, que se desarrollan a partir de los proplastidios; el cual también es un “Organelo unido a la membrana intracelular”.

El componente “Plastidio” presentó un total de 1.285 secuencias que se asociaron con esta clase de componente (Figura 11). Respecto a su rol en la respuesta al estrés por sequía, Ghotbi-Ravandi *et al.* (2019) realizaron un estudio para determinar el papel de la oxidasa terminal de plastidios (PTOX), una proteína localizada en los plastidios, en la respuesta al estrés por sequía en plantas, lo que resultó en que la expresión génica y contenido proteico de PTOX aumentó significativamente bajo condiciones de sequía severa. Por otro lado, Sun *et al.* (2010) indican para un estudio también de plantas sometidas a sequía que la proteína reguladora de detección de Ca²⁺ localizada en plastidios de la hoja aumentó su expresión como mecanismo de tolerancia a la sequía. Así, los autores mencionados anteriormente indican que existen proteínas alojadas en los plastidios que incrementan su expresión génica al someterse a condiciones de sequía, lo que hace posible pensar que este producto génico

expresado en guayacán podría jugar un papel importante en la respuesta al estrés por sequía para la especie.

La Figura 12 muestra en detalle el total de secuencias que se destinan para cada componente celular, los cuales agrupan otros y por ende poseen usualmente un mayor número de secuencias que aquellos componentes que se ramifican más hacia abajo, esto permite entender mejor como se distribuyen las secuencias para cada componente dentro de este dominio de la ontología génica.

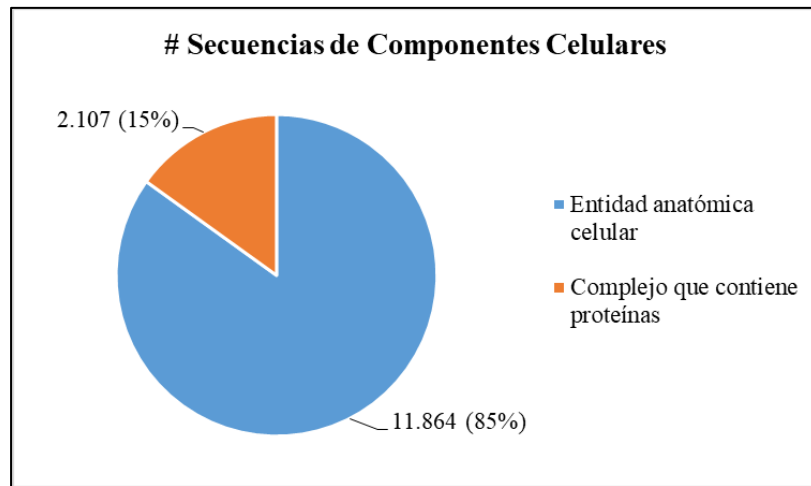


Figura 12. # Secuencias de componentes celulares.

A modo global, respecto a la cantidad de secuencias que se derivan para cada término dentro del dominio de componentes celulares, de las 13.971 secuencias anotadas, un 85% de ellas corresponden a “Entidad anatómica celular” y un 15% a “Complejo que contiene proteínas”. Lo anterior indica que, al nivel del dominio de componentes celulares, son solo dos los procesos para los cuales decodifican la mayoría de las secuencias de ADN expresado.

Por último, se describe una ruta metabólica correspondiente al dominio de “Proceso Biológico” (Figura 13).

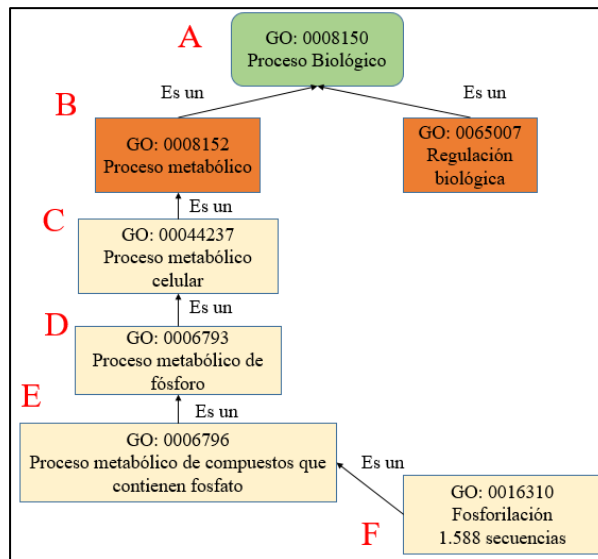


Figura 13. Ruta de procesos biológicos.

Un ejemplo de ruta metabólica del dominio de procesos biológicos que se describe para guayacán (Figura 13), es la “Fosforilación”, el cual se describe en cascada siguiendo las letras en rojo (de A a F).

En primer lugar, un “Proceso Biológico” representa un objetivo específico que el organismo esta genéticamente programa para lograr, el cual se subdivide en varios procesos entre ellos, la “Regulación biológica”, que es cualquier proceso que modula un atributo medible de cualquier proceso biológico, cualidad o función, y también en un “Proceso metabólico”, que se detalla como las reacciones químicas y vías, incluido el anabolismo y catabolismo por medio de los cuales todos los organismos vivos transforman sustancias químicas; este se subdivide en un “Proceso metabólico celular”, que se entiende como las reacciones químicas y vías por los cuales las células individuales transforman sustancias químicas; este a su vez se subdivide en un “Proceso metabólico de fósforo”, que son las reacciones químicas y vías que involucran el elemento no metálico de fósforo o compuestos que contienen fósforo; este a su vez se subdivide en un “Proceso metabólico de compuestos que contienen fosfato”, que son las reacciones químicas y vías que involucran al grupo fosfato, el anión o sal de cualquier ácido fosfórico; dentro de este último se encuentra la “Fosforilación”, la que se define como el proceso de introducir un grupo fosfato a una molecula, usualmente con la formación de un éster, anhídrido o amida fosfórico.

El proceso “Fosforilación” presentó un total de 1.588 secuencias que se asociaron con esta clase de componente (Figura 13). Además, como se describió anteriormente, la fosforilación es de suma importancia en diversos procesos biológicos, que incluyen la señalización hormonal y la respuesta al estrés por sequía (Dai Vu *et al.*, 2016). Específicamente, la fosforilación de proteínas está relacionada con respuestas a la luz y el estrés por temperatura, donde se han identificado proteínas fosforiladas envueltas en el el control transcripcional, la protección/defensa del estrés y percepción y señalización del estrés que poseen una posible relación con la tolerancia al calor mejor desarrollado (Zhang *et al.*, 2020). En base a lo anterior, es posible pensar que este producto génico (fosforilación) expresado en guayacán podría jugar un papel importante en la respuesta al estrés por sequía para la especie.

La Figura 14, muestra en detalle el total de secuencias que se clasificaron para cada proceso biológico, los cuales agrupan otros procesos y por ende poseen usualmente un mayor número de secuencias que aquellos procesos que se ramifican más hacia abajo, esto permite entender mejor como se distribuyen las secuencias para cada proceso dentro de este dominio de la ontología génica.

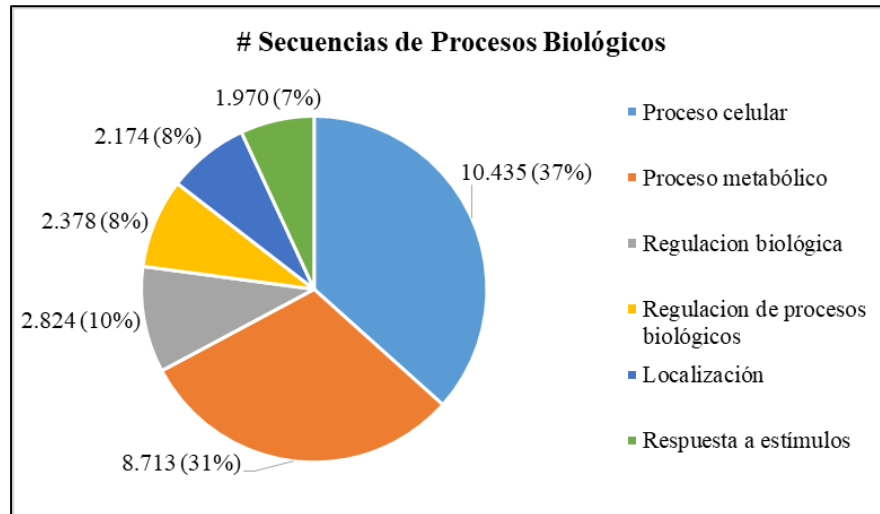


Figura 14. # Secuencias de procesos biológicos.

A modo global, respecto a la cantidad de secuencias que se derivan para cada término dentro del dominio de procesos biológicos, de las 28.494 secuencias anotadas, un 37% de ellas corresponden a “Proceso celular”, un 31% a “Proceso metabólico”, un 10% a “Regulación biológica”, un 8% a “Regulación de procesos biológicos”, un 8% a “Localización” y un 7% a “Respuesta a estímulos” (Figura 14). Lo anterior indica que, al nivel del dominio de procesos biológicos, existen seis procesos para los cuales decodifican la mayoría de las secuencias de ADN expresado. De estos, destaca la “Respuesta a estímulos” por su clara implicancia en la tolerancia de la planta a condiciones de temperaturas más altas y a una escasez de lluvias que pueden derivar en un déficit hídrico, y si se prolonga lo suficiente en un estrés hídrico, además de participar en otras respuestas a diversos cambios en el ambiente de la planta.

4. CONCLUSIONES

Para el objetivo 1, es posible concluir que los valores de heterocigosidad H , son moderados a altos y no presentan diferencias a nivel de localidades (Colina/El Melón) en promedio, pero sí presentan diferencias al compararlos entre los tratamientos de riego normal y restricción hídrica, lo que indicaría que aquellas poblaciones con restricción hídrica ven disminuida la expresión de su diversidad genética en comparación con aquellas de riego normal. Por otro lado, la diferenciación genética F_{st} entre las poblaciones de Colina y El Melón en promedio es baja, lo que indica una escasa o nula estructuración genética entre estas poblaciones. Esto implica que la mayoría de la diversidad genética promedio en estas poblaciones guayacán se encuentra dentro de las poblaciones y no entre ellas.

Concluyendo para el objetivo 2, se puede decir que hay una diferencia en la expresión evaluada a través del marcador SNPs para los tres dominios de la ontología génica, donde varios “procesos biológicos” que guardan relación con el estrés por sequía tienen una sobre expresión bajo condiciones de restricción hídrica, lo que evidencia el impacto que tiene este tratamiento en la respuesta a la escasez de agua expresado a nivel del ARN. Los términos que se describen concuerdan con los de otros autores que describen genes para otras especies de plantas, también sometidas a restricción hídrica o sequía, por lo que se concluye que la información recabada puede ser una base para un próximo diseño de marcadores moleculares para mejorar la comprensión de los mecanismos de adaptación al estrés por sequía, en las poblaciones naturales de guayacán.

Por último, para el objetivo 3, se indica que, respecto a los tres dominios de la GO, se tiene una mayor cantidad de “procesos biológicos” expresados en comparación con “funciones moleculares” y “componentes celulares”. Es importante mencionar que debido a que solo se analizan parte del total de contigs del transcriptoma de novo de *Porlieria chilensis*, puede que existan aún más “procesos expresados” que no se describieron en el presente trabajo. Sin embargo, es una buena aproximación o base para comprender mejor las diversas rutas que posee guayacán respecto a los genes que se expresan tanto en condiciones de riego normal como riego restringido. Sería interesante para otros trabajos poder abordar cómo cambian las rutas o qué procesos se expresan más en condiciones de riego normal con respecto a riego con restricción.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van den beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., y Blankenberg, D. 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research* 46: 537–544. (1)
- Alvarado, J. 2017. Anotación del genoma. [en línea] <<http://conogasi.org/articulos/anotacion-de-genoma/>> [visita: 31 de agosto de 2020] (2)
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos para la fisiología vegetal. 2ª ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. 522 p. (3)
- Azpilicueta, M., Marchelli, P., y Gallo, P. 2009. The effects of Quaternary Glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics and Genomes* 5: 561-571. (4)
- Babraham bionformatics, S.A. FastQC. [en línea] <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>> [visita: 31 de agosto de 2020] (5)
- Bambach, N., Meza, F., Gilabert, H. y Miranda, M. 2013. Impacts of climate change on the distribution of species and communities in the Chilean Mediterranean ecosystem. *Regional Environmental Change* 13: 1245–1257. (6)
- Baranzelli, M., Johnson, L., Cosacov, A. y Sérsic, A. 2014. Historical and ecological divergence among populations of *Monttea chilensis* (Plantaginaceae), an endemic endangered shrub bordering the Atacama Desert, Chile. *Evol Ecol.* 28: 751–774. (7)
- Bhargava, S. y Sawant, K. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* 132: 21–32. (8)
- Carril, E. y García, A. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* 2(3): 119-145. (9)
- Carvalho, G., Vergara-Meriño, B., Díaz, A., Villagra, C., y Guerrero, P. 2019. Rocky outcrops conserve genetic diversity and promote regeneration of a threatened relict tree in a critically endangered ecosystem. *Biodiversity and Conservation* 28: 2805–2824. (10)
- Chequer, D., Pometti, C., Cony, M., Vilaridi, J., Saidman, B., y Bessega, C. 2020. Genetic variance distribution of SSR markers and economically important quantitative traits in a progeny trial of *Prosopis chilensis* (Leguminosae): implications for the ‘Algarrobo’ management programme. *Forestry*: 1:15. (11)
- Chronopoulou, E. y Labrou, N. 2009. Glutathione Transferases: Emerging Multidisciplinary Tools in Red and Green Biotechnology. *Recent Patents on Biotechnology* 3(3): 211-223. (12)

CLC bio, S.A. Quality-based variant detection. [en línea] <http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbench/350/index.php?manual=Quality_based_variant_detection.html> [visita: 31 de agosto de 2020] (13)

Cock, P., Fields, C., Goto, N., Heuer, M. y Rice, P. 2009. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research* 38(6): 1767–1771. (14)

Collada, C. y Jimenez, P. 2008. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* 9(2): 237-248. (15)

Conesa, A. y Götz, S. 2008. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *International Journal of Plant Genomics*: 1–12. (16)

Cortés, J. 2014. Respuestas ecofisiológicas desarrolladas por *Prosopis chilensis* (MOL) Stuntz frente a condiciones de restricción hídrica controlada en vivero. Memoria Ingeniería Forestal. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza. 30 p. (17)

Cruz de Carvalho, M. 2008. Drought stress and reactive oxygen species Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3(3): 156-165. (18)

Dai Vu, L., Stes, E., Van Bel, M., Nelissen, H., Maddelein, D., Inzé, D., Coppens, F., Martens, L., Gevaert, K. y De Smet, I. 2016. An up-to-date workflow for plant (phospho) proteomics identifies differential drought-responsive phosphorylation events in maize leaves. *Journal of Proteome Research* 15(12): 4304-4317. (19)

Ding, L., Lu, Z., Gao, L., Guo, S. y Shen, Q. 2018. Is nitrogen key determinant of water transport and photosynthesis in higher plants upon drought stress? *Frontiers in Plant Science* 9. (20)

Domínguez-Domínguez, O., González-rodríguez, A., García de León, F. y Casas, A. 2019. Diversidad genética. En: *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado* 2(3): 19-29. (21)

Donoso, S., Peña-Rojas, K., Pacheco, C., Luna, G. y Aguirre, A. 2011. Respuesta fisiológica y de crecimiento en plantas de *Quillaja saponaria* y *Cryptocarya alba* sometidas a restricción hídrica. Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Departamento de Silvicultura. Universidad de Chile. *Bosque* 32 (2):187-195. (22)

Donoso, S., Peña-Rojas, K., Pacheco, C., Durán, S., Santelices, R., Mascaró, C. 2015. The physiological and growth response of *Acacia caven* under water stress and the application of different levels of biosolids. *Cien. Inv. Agr.* 42(2): 273-283. (23)

Espinoza, C., Allen, T., Hieb, A., Kugel, J. y Goodrich, J. 2004. B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nature structural & Molecular biology* 11(9): 822-829. (24)

- Fan, W., Zhang, Z. y Zhang, Y. 2009. Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Cell Reports* 28: 975–984. (25)
- Fan, F., Zhang, Y., Wang, S., Han, Y., Wang, L. y Lu, D. 2018. Characterization of the oxidative protein folding activity of a unique plant oxidoreductase, Arabidopsis protein disulfide isomerase-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495: 1041-1047. (26)
- Fischer, M., Rellstab, C., Leuzinger, M., Roumet, M., Gugerli, F., Shimizu, K., Holderegger, R. y Widmer, A. 2017. Estimating genomic diversity and population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. *BMC Genomics* 18, 69. (27)
- Gamez, B., Boachie, R., Tsopmo, A. y Udenigwe, C. 2019. Occurrence, properties and biological significance of pyroglutamyl peptides derived from different food sources. *Food Science and Human Wellness*. (28)
- Garreaud, R., Alvarez-Garretón, C., Barichivich, J., Boisier, J., Christie, D., Galleguillos, M., Lequesne, C., Mcphee, J. Y Zambrano-Bigiarini, M. 2017. The 2010–2015 megadrought in Central Chile: impacts on regional hydroclimate and vegetation. *Hydrol Earth Syst Sci* 21: 6307–6327. (29)
- Garreaud, R., Boisier, J., Rondanelli, P., Montecinos, A., Sepúlveda, H. y Veloso-Aguila, D. 2020. The Central Chile Mega Drought (2010–2018): A climate dynamics perspective. *International Journal of Climatology*, 40(1): 421-439. (30)
- Geneontology, S.A. Relations in the Gene Ontology. [en línea] <<http://geneontology.org/docs/ontology-relations/>> [visita: 31 de agosto de 2020] (31)
- Ghotbi-Ravandi, A., Shariati, M., Shobbar, Z. y Shahbazi, M. 2019. Expression pattern and physiological roles of Plastid Terminal Oxidase (PTOX) in wild and cultivated barley genotypes under drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 162: 313–320. (32)
- Giménez, D. 2017. Análisis de expresión diferencial para datos de Next Generation Sequencing (NGS) con múltiples condiciones experimentales. Tesis para postular al título de Magister. Universidad Autónoma de Madrid. 57 p. (33)
- Goddjin, O. y Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in plant science* 4(8): 315-319. (34)
- González, M., Gómez-González, S., Lara, A., Garreaud, R. Y Díaz-Hormazábal, I. 2018. The 2010-2015 Megadrought and its influence on the fire regime in central and south-central Chile. *Ecosphere* 9(8): 17 p. (35)
- Guan-Yi, D., Yin, J., Kain-En, L., Ding-Kang C., Liu, Z., Fang-Cheng, B., Rong, C. y Yao, N. 2020. The Arabidopsis AtGCD3 protein is a glucosylceramidase that preferentially

hydrolyzes long-acyl-chain glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* 295(3): 717-728. (36)

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., y Tesler, G. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29(8): 1072–1075. (37)

Haas, B. 2018. RNA-Seq De novo Assembly Using Trinity. [en línea] <<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>> [visita: 31 de agosto de 2020] (38)

Hamrick, J., Godt, M. y Sherman-Boyles, S. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124. (39)

Hamrick, J y Godt, M. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (1996) 351, 1291-1298. (40)

Hasbún, R., González, J., Iturra, C., Fuentes, G., Alarcón, D. y Ruiz, E. 2016. Using genome-wide SNP discovery and genotyping to reveal the main source of population differentiation in *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. in Chile. *International Journal of Genomics*, 10p. (41)

Hechenleitner, P., Gardner, M., Thomas, P., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P. y Martínez, C. 2005. Plantas Amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo, Valdivia. 188 p. (42)

Hong, Y., Zhang, W. y Wang, X. 2010. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell and Environment* 33(4): 627–635. (43)

Holsinger, K., y Weir, B. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F_{st}*. *Nat Rev Genet* 10(9): 639-650. (44)

Huang, Y., Huan W., Hong, C., Lur, H. y Chang, M. 2012. Comprehensive analysis of differentially expressed rice actin depolymerizing factor gene family and heterologous overexpression of OsADF3 confers *Arabidopsis thaliana* drought tolerance. *Rice* 5. (45)

Ipinza, R. 2015. La genética cuantitativa y la conservación genética. En: *Conservación de Recursos Genéticos Forestales. Principios y Prácticas*. 77-89. (46)

Jarzyński, K. y Jasinski, M. 2014. Membrane transporters and drought resistance – a complex issue. *Front Plant Sci*. 5. (47)

Ji, K., Zhang, D., Motital, L., Boccara, M., Lachenaud, P. y Meinhardt, L. 2012. Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 441–453. (48)

Kohzuma, K. Cruz, J., Akashi, K., Hoshiyasu, S., Nakajima, Y. Yokota, A. y Kramer, D. 2009. The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant, Cell and Environment* 32(3): 209–219. (49)

- Kondrák, M., Marincs, F., Antal, F., Juhász, Z. y Bánfalvi, Z. 2012. Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biology* 12. (50)
- Kramer, P. 1983. Water relation of plants. Academic Press. New York. 342-389 p. (51)
- Laurie, S. y Halford, N. 2001. The role of protein kinases in the regulation of plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 34: 253–265. (52)
- Letelier, L., Harvey, N., Valderrama, A., Stoll, A., y González-Rodríguez, A. 2015. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in soapbark, *Quillaja saponaria* (Quillajaceae) *Applications in Plant Sciences* 3(5): 1-4. (53)
- Liang, C., Wang, W., Wang, J., Ma, J., Li, C., Zhou, F., Zhang, S., Yu, Y., Zhang, L., Li, W. y Huang, X. 2017. Identification of differentially expressed genes in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves and roots under drought stress by RNA sequencing. *Botanical Studies* 58. (54)
- Liu, Y., Shi, Y., Song, Y., Wang, T. y Li, Y. 2010. Characterization of a Stress-induced NADP-isocitrate Dehydrogenase Gene in Maize Confers Salt Tolerance in Arabidopsis. *J. Plant Biol.* 53(2): 107–112. (55)
- Loayza, A., Ríos, R., Carvajal, D. y Gatica, A. 2015. Estado de conservación de *Porlieria chilensis*: Evaluación a través de modelos poblacionales matriciales, ecología y patrones de distribución. Estudio financiado por el Fondo de Investigación del Bosque Nativo-CONAF. 37 p. (56)
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). (57)
- Lyzenga, W. y Stone, S. 2012. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *Journal of Experimental Botany* 63(2): 599–616. (58)
- Marchelli, P., y Gallo, L. 2001. Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridization. *Heredity* 87: 284–293. (59)
- Miranda, M., Doobs, C., Olave, M. y Olave, P. 2019. Sequía y olas de calor extremas: registro de su efecto en comunidades y especies esclerófilas del Mediterráneo Central de Chile. En: Seminario Bosque Esclerófilo ante Olas de Calor: nuevos escenarios y desafíos que impone el cambio climático. 13 de junio de 2019. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile. (60)
- Mirzaei, M., Pascovici, D., Atwell, B., Haynes, P. 2012. Differential regulation of aquaporins, small GTPases and V-ATPases proteins in rice leaves subjected to drought stress and recovery. *Proteomics* 12(6): 864–877. (61)

- MMA. 2008. Ficha de especie clasificada: *Porlieria chilensis*. [en línea] <http://especies.mma.gob.cl/CNMWeb/Web/WebCiudadana/ficha_indepen.aspx?EspecieId=262> [visita: 20 de julio de 2020]. (62)
- Molina-Montenegro, M., Baldelomar, M., Atala, C., y Torres-Díaz, C. 2020. A tradeoff between fitness-related traits mask facilitation in a semiarid ecosystem. *Oikos* 129(8): 1196-1203. (63)
- Montenegro, G., Carrasco, B., Arellano, E., Morales, N., Fernández, I., Olivares, L. y Gómez, M. 2010. Distribución, hábitat potencial y diversidad genética de poblaciones Belloto del Norte (*Beilschmiedia miersii*) y Lúcumo chileno (*Pouteria splendens*). Investigación financiada por el Fondo de Investigación del Bosque Nativo. (64)
- Mora, F., Arriagada, O., Ballesta, P. y Ruiz, E. 2016. Genetic diversity and population structure of a drought-tolerant species of *Eucalyptus*, using microsatellite markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 26: 274–281. (65)
- Moraga, F. y Aquea, F. 2015. Composition of the SAGA complex in plants and its role in controlling gene expression in response to abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 6: 865. (66)
- Moreno-Letelier, A. 2007. *Ecología Molecular*. Coordinación Editorial, Diseño de Interiores y Tipografía a cargo de Raúl Marcó del Pont Lalli, México. 594 p. (67)
- Moreno, L. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 27(2): 179-191. (68)
- Muñoz, M., Squeo, F., León, M., Tracol, Y. y Gutiérrez, J. 2008. Hydraulic lift in three shrub species from the Chilean coastal desert. *Journal of Arid Environments* 72(5): 624-632. (69)
- Nagahatenna, D., Langridge, P. y Whitford, R. 2015. Tetrapyrrole-based drought stress signalling. *Plant Biotechnology Journal* 13(4): 447–459. (70)
- NCBI, S.A. Basic Local Alignment Search Tool. [en línea] <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> [visita: 31 de agosto de 2020]. (71)
- NIH, S.A. (a). Marcador genético. [en línea] <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Marcador-genetico> [Visita: 20 de julio de 2020]. (72)
- NIH, S.A. (b). Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) [en línea] <<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismos-de-nucleotido-único>> [Visita: 20 de julio de 2020]. (73)
- NIH, S.A. (c). Hoja de datos del mapeo genético [en línea] <<https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Hoja-de-datos-del-mapeo-gen%C3%A9tico>> [Visita: 5 de marzo de 2021]. (74)

Núñez-Ávila, M., Uriarte, M., Marquet, P., y Armesto, J. 2011. Microsatellite markers for the relict tree *Aextoxicon Punctatum*: The only species in the Chilean endemic family Aextoxicaceae. *American Journal of Botany*: 30–32. (75)

Owtrim, G. 2006. RNA helicases and abiotic stress. *Nucleic Acids Research* 34(11): 3220–3230. (76)

Parra y Ramírez, S.A. Algoritmos de comparación de secuencias Blast. [en línea] <<http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/Blast/blast.php#:~:text=BLAST%20resulta%20el%20algoritmo%20a,de%20la%20bases%20de%20datos.>> [Visita: 5 de marzo de 2021]. (77)

Parraguirre, C., Vargas, J., Ramírez, P., Azpíroz, H. y Jasso, J. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Rev. Fitotec. Mex* 25 (3): 279 – 287. (78)

Parthasarathy, A., Savka, M. y Hudson, A. 2019. The Synthesis and Role of β -Alanine in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10: 921. (79)

Peña-Rojas, K., Aranda, X., y Fleck, I. 2004. Stomatal limitation to CO₂ assimilation and down-regulation of photosynthesis in *Quercus ilex* L. resprouts under slowly-imposed drought. *Tree Physiology* 24: 813-822. (80)

Peña-Rojas, K., Donoso, S., Gangas, R., Durán, S. y Ilabaca, D. 2018. (a). Efectos de la sequía en las relaciones hídricas, crecimiento y distribución de biomasa en plantas de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) cultivadas en vivero. Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Departamento de Silvicultura. Universidad de Chile. *Interciencia* 41: 36-42. (81)

Peña-Rojas, K., Donoso, S., Pacheco, C., Riquelme, A., Gangas, R., Guajardo, A. y Durán, S. 2018. (b). Respuestas morfo-fisiológicas de plantas de *Lithraea caustica* (Anacardiaceae) sometidas a restricción hídrica controlada. *Bosque* 39: 27-36. (82)

Phan Tran, L., Nakashima, K., Sakuma, Y. Simpson, S., Fujita, Y., Maruyama K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2004. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *The Plant Cell* 16(9): 2481–2498. (83)

Porth, I. y El-Kassaby, Y. 2014. Assessment of the Genetic Diversity in Forest Tree Populations Using Molecular Markers. *Diversity* 6: 283-295. (84)

Premoli, A. 1997. Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American Nothofagus. *J. Biogeogr.* 24: 883–892. (85)

Premoli, A., Vergara, A., Souto, C., Lara, A y Newton, A. 2003. Lowland valleys shelter the ancient conifer *Fitzroya cupressoides* in the Central Depression of southern Chile. *J. R. Soc. N Z* 33: 623–631. (86)

- Quintanilla, M. 2019. Respuestas morfofisiológicas desarrolladas por *Porlieria chilensis* I. M. Johnston (Guayacán) bajo restricción hídrica en vivero. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza. 32p. (87)
- Rabbani, M., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiology* 133(4): 1755–1767. (88)
- Rizhsky, L., Liang, H. y Mittler, R. 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat shock on gene expression in Tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143–115. (89)
- Robinson, M., McCarthy, D. y Smyth, G. 2009. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140. *Bioinformatics* 26: 139-40. (90)
- Ruíz-Lozano, J., Azcón, R. y Palma, J. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist* 134(2): 327-333. (91)
- Scayle. S. A. Genepop. [en línea] <<https://www.scayle.es/manual/es/hpc/software-instalado/genepop>> [Visita: 02 de septiembre de 2020]. (92)
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. y Shinozaki, K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10(3): 296–302. (93)
- Shinozaki, K y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58(2): 221–227. (94)
- Shokat, S., Grobkinsky, D., Roitsch, T. y Liu, F. 2020. Activities of leaf and spike carbohydrate metabolic and antioxidant enzymes are linked with yield performance in three spring wheat genotypes grown under wellwatered and drought conditions. *BMC Plant Biology* 20. (95)
- Silva, P., Silva-Junior, O., Resende, L., Sousa, V., Aguilar, A. y Grattaplagia, D. 2020. A 3K Axiom SNP array from a transcriptomewide SNP resource sheds new light on the genetic diversity and structure of the iconic subtropical conifer tree *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. *Plos One*. 25 p. (96)
- Souto, C., Heinemann, K., Kitzberger, T., Newton, A. y Premoli, A. 2012. Genetic diversity and dtructure in *Austrocedrus chilensis* Populations: Implications for Dryland Forest Restoration. *Restoration Ecology* 20(5): 568–575. (97)
- Stolf-Moreira, R., Lemos, E., Carareto-Alves, L., Marcondes, J., Pereira, S., Rolla, A., Pereria, R., Neumaier, N., Binneck, E., Abdelnoor, R., Oliveira, M., Marcenilo, F., Farias, J.

- y Nepomuceno, A. 2011. Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress. *Plant Mol Biol Rep* 29: 19–34. (98)
- Stone, J. y Walker, J. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108: 451-457. (99)
- Sun, C., Johnson, J., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R. y Lou, B. 2010. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology* 167: 1009–1017. (100)
- Tamburrino, I. 2018. Patrones de estructuración y flujo genético en cuatro taxa del género *Eriosyce* (Cactaceae) en el Sitio Prioritario para la Conservación Los Molles – Pichidanguí. Seminario para optar al Título de Biólogo Ambiental. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 60p. (101)
- Torres-Díaz, C., Ruíz, E., González, F., Fuentes, G. y Cavieres, L. 2007. Genetic Diversity in *Nothofagus alessandrii* (Fagaceae), an Endangered Endemic Tree Species of the Coastal Maulino Forest of Central Chile. *Annals of Botany* 100: 75-82. (102)
- Tracól, Y., Gutiérrez, J. y Squeo, F. 2011. Plant Area Index and microclimate relationships for three native shrub species from a Chilean semiarid community. *Journal of Arid Environments* 75: 1- 6. (103)
- Tripp, M. 2009. Análisis de la estructura poblacional del Dorado (*Coryphaena hippurus*; Linnaeus, 1758) en el noroeste del Pacífico mexicano y Golfo de California mediante el uso de microsatélites. Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Biología marina). Ciudad de la Paz, Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste, S.C. 106p. (104)
- Tusher, V., Tibshirani, R. y Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(9): 5116-5121. (105)
- Varela, S. 2010. Aspectos básicos de la fisiología en respuesta a estrés y el clima como condicionante del mismo en las plantas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (106)
- Vergara, R., Gitzendanner, M., Soltis, D. y Soltis, P. 2014. Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of *Nothofagus* subgenus *Lophozonia* (Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. *Ecology and Evolution* 4(12): 2450–2471. (107)
- Villagra, P. y Cavagnaro, J. 2006. Water stress effects on the seedling growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alpataco*. *Journal of Arid Environments* 64: 390-400. (108)

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. y Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9(5): 245-252. (109)

Wang, D., Li, R., Zou, B., Zhang, X., Cong, J., Wang, R., Xia, Y. y Li, G. 2012. Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 31: 1269–1281. (110)

Wang, X. Vignjevic, M., Jiang, D., Jacobsen, S. y Wollenweber, B. 2014. Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. *Journal of Experimental Botany* 65(22): 6441–6456. (111)

Wang, X., Cai, X., Xu, C., Wang, Q. y Dai, S. 2016. Drought-Responsive Mechanisms in Plant Leaves Revealed by Proteomics. *International Journal of Molecular Sciences* 7(10): 1706. (112)

Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D. y Haig, T. 2001. Allelopathy in wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Applied Biology* 139: 1-9. (113)

Wu, K., Wei, L., Huang, C., Wei, Y., Cao, H., Xu, L., Luo, H., Jiang, S., Deng, Z. y Li, Y. 2018. Transcriptome reveals differentially expressed genes in *Saccharum spontaneum* GX83-10 leaf under drought stress. *Sugar Tech* 20(4). (114)

Wu, Q., Zhao, G., Bai, X., Zhao, W., Xiang, D., Wan, Y., Wu, X., Sun, Y., Tan, M., Peng, L. y Zhao, J. 2019. Characterization of the transcriptional profiles in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) under PEG-mediated drought stress. *Electronic Journal of Biotechnology* 39: 42–51. (115)

Yang, W., Ruan, M., Xiang, M., Deng, A., Du, J. y Xiao, C. 2019. Overexpression of a pectin methylesterase gene PtoPME35 from *Populus tomentosa* influences stomatal function and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 523(2). (116)

Yildirim, K. y Kaya, Z. 2017. Gene regulation network behind drought escape, avoidance and tolerance strategies in black poplar (*Populus nigra* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 115: 183-199. (117)

Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L. y An, L. 2006. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(5-6): 274–83. (118)

Zhang, X., Wu, H., Chen, L., Liu, L. y Wan, X. 2018. Maintenance of mesophyll potassium and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase are associated with physiological responses of tea plants to drought and subsequent rehydration. *The Crop Journal* 6(6). (119)

Zhang, X., Zhuang, L., Liu, Y., Yang, Z. y Huang, B. 2020. Protein phosphorylation associated with drought priming-enhanced heat tolerance in a temperate grass species. *Horticulture Research* 7. (120)

Zhuanfang, H., Xinhai, L., Chuanxiao, X. y Jianfeng, W. 2011. Identification of Functional Genetic Variations Underlying Drought Tolerance in Maize Using SNP Markers. *Journal of Integrative Plant Biology* 53(8): 641-52. (121)

6. ANEXOS Y APÉNDICES

APÉNDICE I

Cuadro 13. Glosario.

Término	Definición
$H_{e/o}$	Heterosigosis esperada y observada. Probabilidad de que dos alelos elegidos al azar de la población sean diferentes.
F_{st}	Índice de fijación. Correlación de alelos elegidos al azar dentro de la misma subpoblación en relación con toda la población.
Contig	Serie de secuencias superpuestas de ADN utilizadas para hacer un mapa físico que reconstruye la secuencia original de ADN de un cromosoma o de una región de un cromosoma.
TRIZol	Reactivo empleado para la extracción de ARN, como así para la obtención de ADN y de proteínas.
Transcriptoma	Lecturas de genes del ADN se llaman transcritos, y un transcriptoma es una colección de todas las lecturas de genes presentes en una célula.
Ensamblaje de <i>novo</i>	Proceso de secuenciar un organismo de nuevo, del cual no hay una secuencia modelo o de referencia con el fin de crear una.
RNA-seq	Secuenciación del Transcriptoma Entero para Clonación al Azar
Ontología génica (GO)	Representación que describe diversos conocimientos de la biología molecular con respecto a tres aspectos: funciones moleculares, componentes celulares, y procesos biológicos.
Función molecular	Aspecto de GO que describe las actividades a nivel molecular desarrolladas por productos genéticos.
Componente celular	Aspecto de GO que describe las ubicaciones relativas a las estructuras celulares en donde un producto génico desarrolla una función.
Proceso biológico	Aspecto de GO que describe los procesos más grandes, o "programas biológicos" realizados por múltiples actividades moleculares.

APÉNDICE II

Potencial hídrico de poblaciones de guayacán según condición

Antes de la extracción del ARN se evaluaba el potencial hídrico (Ψ) de cada individuo según su condición de riego. Con el fin de verificar las diferencias antes los grupos se realizó una prueba estadística de Mann-Whitney-Wilcoxon para determinar si existe alguna diferencia significativa en las medias del Ψ de individuos de Colina y Melón bajo condiciones normales de riego contra aquellos que se sometieron a restricción hídrica, a fin de verificar el efecto que tienen los tratamientos en este parámetro. Adicionalmente se puede indicar que el experimento se inició con un número mayor de individuos que los finalmente analizados, pues muchos individuos de ambas poblaciones perdieron sus hojas antes de llegar al Ψ deseado y otros si bien tenía hojas, la cantidad y calidad de ARN no era suficiente para continuar el experimento. El fenotipo requerido para este experimento era individuos con hojas pues era el órgano al cual se le extraía el ARN.

Para la población de Colina_n el promedio de Ψ fue de -24,31 bar, mientras el de Colina_e -65,77 bar. Por otro lado, la población de Melón_n tuvo un promedio de Ψ de -26,93 bar y el de Melón_e fue de -76,91 bar.

Para la comparación entre individuos de Colina_n y aquellos de Colina_e se obtuvo un p-value de 1,20e-05, lo que indica que hay una diferencia significativa en el promedio del Ψ que exhibieron los individuos de cada condición, siendo esta más alta en la población de Colina_n.

Para la comparación entre individuos de Melón_n y aquellos de Melón_e aquellos con restricción hídrica se obtuvo un p-value de 8,54e-06, lo que indica que hay una diferencia significativa en el promedio del Ψ que exhibieron los individuos de cada condición, siendo esta más alta en la población de Melón_n. Los valores anteriores, incluyendo la desviación estándar, mínimos y máximos de potencial hídrico para cada población se muestran a continuación.

Cuadro 14. P-value y valores de potencial hídrico (Ψ) para las poblaciones.

Datos	Colina_n	Colina_e	Melón_n	Melón_e
Promedio (bar)	-24,31	-65,77	-26,93	-76,91
Desviación estándar (bar)	- 10,07	-28,47	-8,38	-21,38
Máximo (bar)	-41,38	-92,85	-39,25	-92,8
Mínimo (bar)	-8,54	-3,28	-11,68	-25,81
P-value	1,20 e-05		8,54 e-06	

Los valores del Ψ que se obtuvieron fueron en general mucho más altos que los que registrados por Quintanilla (2019), quien indica que el rango del Ψ para plantas bajo riego control se movía entre los -4 y -17 bar, mientras para plantas bajo restricción hídrica el rango iba entre -5 y -30 bar. Esto puede ser indicio de que en las plantas del presente estudio se aplicó una mayor restricción hídrica que la usada por Quintanilla.

Los resultados anteriores coinciden con lo descrito por Quintanilla (2019), que indica que al someter las plantas de guayacán a restricción hídrica existe una disminución de su potencial hídrico, esto a su vez presenta concordancia con otros autores para estudios similares mencionados. Lo anterior demuestra aun más que la restricción hídrica evaluada en el sustrato afecta negativamente el estado hídrico de los individuos, obteniéndose valores de Ψ_a más negativos en condiciones de restricción hídrica que con riego normal.

APÉNDICE III

A continuación, se describe el procedimiento para la obtención de las bases de datos:

Después de extraer el ARN de los individuos de guayacán para las dos condiciones de las dos poblaciones estudiadas, se determina su calidad para secuenciarlo mediante la plataforma Illumina, las secuencias fueron procesadas según el esquema siguiente:

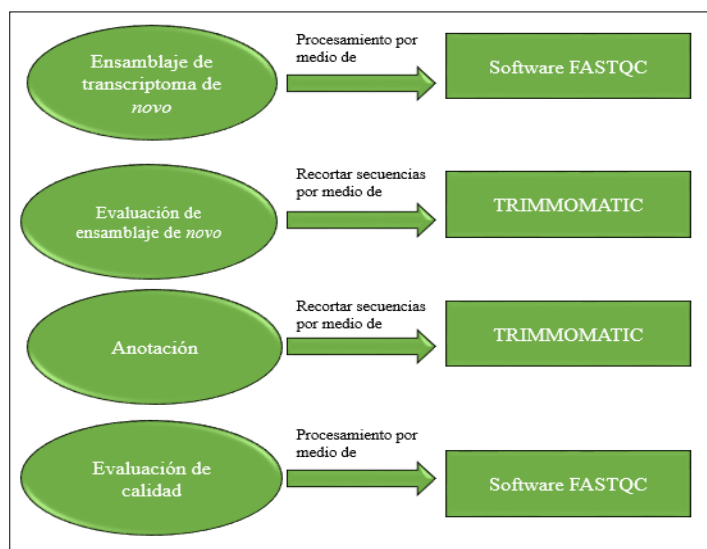


Figura 15. Pasos para el filtrado y control de calidad de secuencias.

Filtrado de secuencias y control de calidad

Se realizó una evaluación de calidad de las secuencias por medio del software *FastQC* que es una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento que utiliza el lenguaje Java, lo que redujo el tamaño de la base de datos dejando solo secuencias de alta calidad (valor de control de calidad promedio mayor a 30) para su posterior análisis (Babraham Bioinformatics, S.A). El software *FastQC* puede extraer datos de archivos FASTQ, el cual es un formato basado en texto usado para almacenar tanto una secuencia biológica (usualmente una secuencia de nucleótidos) como sus puntuaciones de calidad correspondientes, siendo el estándar para almacenar la salida de instrumentos de secuenciación de alto rendimiento como el analizador de genoma Illumina (Cock *et al.*, 2009).

Luego se removieron los adaptadores remanentes y secuencias de bajo tamaño (< 50 pb) por *TRIMMOMATIC*, que es una herramienta usada para orientar y recortar datos de Illumina en formato FASTQ, y que también elimina adaptadores. Se removieron secuencias de baja calidad por *TRIMMOMATIC* y se evaluó de nuevo la calidad de las secuencias resultantes por *FastQC*.

Ensamblaje de *novo* Guayacán

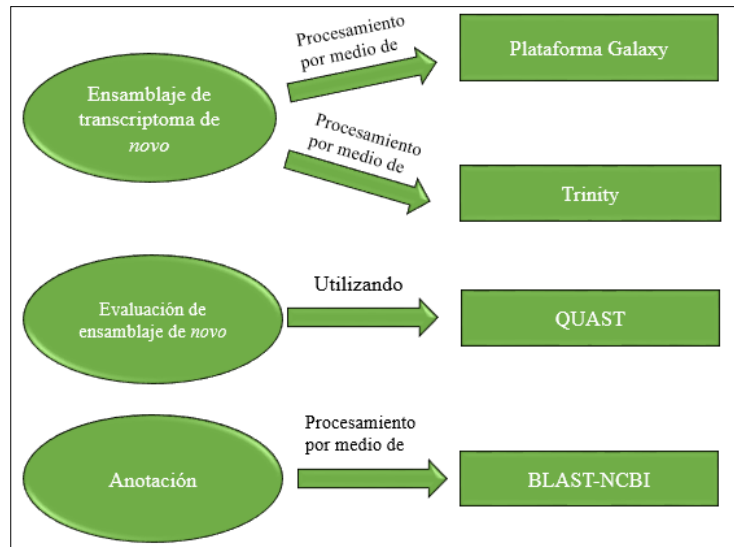


Figura 16. Pasos para el ensamblaje de novo.

Se realizó un ensamblaje de transcriptoma de *novo* (método para crear un transcriptoma sin la ayuda de un genoma de referencia), utilizando *Galaxy*, que es una plataforma de análisis de datos biológicos con una de sus ramas en la genómica utilizándose para la expresión génica y el ensamblaje del genoma (Afgan *et al.*, 2018); y Trinity versión_2013-02-25, que es un método para la reconstrucción de *novo* eficiente y robusto de transcriptomas a partir de datos de ARN-seq (Haas, 2018).

Se evaluó el ensamblaje de *novo* por QUAST, herramienta de evaluación de calidad para ensamblajes genómicos que no requiere necesariamente un genoma de referencia (Gurevich *et al.*, 2013). Para la anotación se utilizó BLAST, programa que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas, comparando secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calculando la significación estadística (NCBI, S. A). Lo anterior permitió identificar la función de genes relacionados a la biología molecular y su asignación mediante términos de ontología génica (GO). Las ontologías de GO están estructuradas como un gráfico, con términos como nodos y las relaciones entre términos como aristas. Así como se define cada término de GO, las relaciones entre sus términos también se categorizan y definen. Algunas de las relaciones comúnmente usadas en GO son: “Es un”, “parte de”, “tiene parte de”, “regula”, “regula negativamente”, y “regula positivamente” (Geneontology, S.A).

Identificación y filtrado de marcadores moleculares SNPs

Del ensamblaje de *novo* resultaron 101.228 contigs, a partir de los cuales se obtuvieron los SNPs. Los SNPs que se identificaron dentro de estos contig se obtuvieron mediante la “Detección de variantes según la calidad” por medio del software CLC Genomics Workbench versión 7.0.4, el que encuentra todas las variaciones cubiertas por lecturas alineadas (CLC bio, S.A). En total se identificaron 2.985 SNPs finales filtrados. El filtrado de los SNPs se realizó mediante pruebas de Mínima Frecuencia Alélica (MAF).

Análisis de expresión diferencial

Para encontrar SNPs expresados diferencialmente de la población control de aquellos bajo restricción hídrica se hizo un mapeo (proceso que entrega información sobre que “cromosoma” contiene tal gen y su ubicación exacta en este (NIH, S.A (c))) de las lecturas filtradas al transcriptoma *de novo* anotado por medio de CLC Genomics Workbench, se realizó un análisis de expresión diferencial por DESeq2, software que analiza datos de conteo obtenidos en ensayos de secuenciación de alto rendimiento como el RNA-Seq y realiza pruebas de análisis de expresión diferencial (Love *et al.*, 2014). Finalmente, para un análisis de enriquecimiento se usó el software BLAST2GO, el que procesa datos de anotaciones resultantes principalmente basadas en el vocabulario de ontología génica (GO) (Conesa y Götz, 2008), como muestra la Fig. 17:

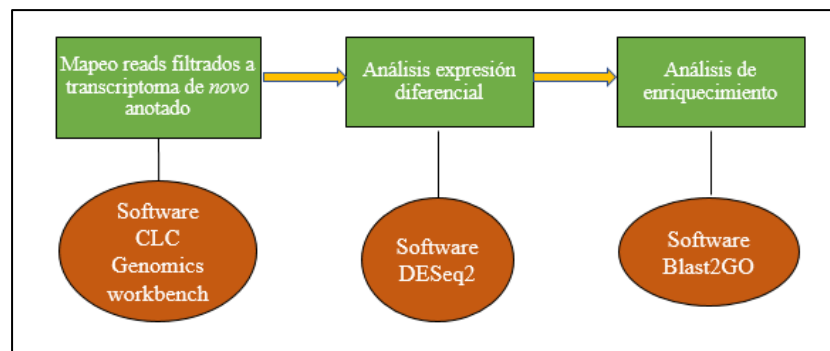


Figura 17. Procesamiento para el análisis de expresión diferencial.

APÉNDICE IV

Cuadro 15. Términos GO con posible implicancia en la respuesta a la sequía. (*) Indica el número de SNP que están en equilibrio HW del total.

Nombre	Descripción	Ref.
F: GO: 0015250 Actividad de canales de agua	La conductividad hidráulica de la raíz, el flujo de agua por medio del área de la superficie de la raíz se rige por el ABA y la sequía. Bajo condiciones de déficit hídrico, la conductividad hídrica de las raíces baja para evitar la pérdida de agua de las raíces provocada por la disminución del potencial hídrico del suelo. La presencia de canales de agua forma parte de los principales determinantes a corto plazo de la conductividad hidráulica de la raíz. 2/2 SNPs bajo equilibrio HW.* SNP 35.581.	(47)
F: GO: 0031072 Unión a proteínas de choque térmico	Las proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) corresponden a un tipo de chaperonas, las cuales desempeñan un rol importante en proveer tolerancia al estrés abiótico. Existe una asociación entre HSP y ROS, lo que sugiere que las plantas han evolucionado con el fin de tener un mayor grado de regulación sobre la toxicidad de ROS, usándolo como inductor para inducir HSP logrando mejores adaptaciones. 4/4 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 11.361.	(89)
F: GO: 0015035 Proteína disulfuro oxidoreductasa	En <i>Arabidopsis</i> se encontró que se requiere proteínas disulfuro-isomerasa para que las plantas crezcan bajo condiciones reductoras, las cuales se dan bajo estrés oxidativo el cual es propiciado por la sequía. 2/2 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 50.603.	(26)
P: GO: 0006508 Proteólisis	La proteólisis es la degradación de enzimas mediante enzimas proteasas o por medio de la digestión intramolecular. Se han descrito como un grupo de proteínas expresadas bajo estrés hídrico. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 50.373.	(68)
F: GO: 0004124 Actividad sintasa de cisteína	La cisteína posee propiedades antioxidantes y es un constituyente del glutatión, un antioxidante soluble en agua con un rol importante en la eliminación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), generadas bajo condiciones de estrés abiótico como por ejemplo por sequía. Además, la glutatilación de proteínas puede contribuir a los mecanismos de defensa que otorga tolerancia a la desecación. 3/3 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 47.730.	(111)

F: GO: 0004348 Actividad de gluco silceramidas	Glucosilceramidas son lípidos de membrana que se encuentran en la mayoría de los organismos eucariotas que son claves para la aclimatación al estrés, siendo esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. 13/18 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 47.336.	(36)
F: GO: 0016301 Actividad de quinasas	Su expresión se induce por la sequía, el estrés salino y el tratamiento con ácido abscísico (ABA). Autores indican un posible vínculo entre las cascadas de señalización de fosfoinositidos y las respuestas al estrés hídrico en plantas. Las proteínas quinasas tienen importancia en las vías de transducción de señales. Un estudio con maíz indica que pueden ocupar un rol en la transducción de señales del maíz en respuesta al estrés por sequía. 6/6 SNPs NO están bajo equilibrio HW. SNP 47.266.	(52) y (99)
F: GO: 0016772 Actividad de transferasa	Existen un tipo de transferasa denominadas como Transferasas de glutatión citosólico (GST), las cuales se usan para el desarrollo de plantas transgénicas con una mayor resistencia al estrés biótico y abiótico. 7/7 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 45.274.	(12)
F: GO: 0016920 Péptidos de piroglutamil pGlu	Factores como el calor, altas presiones y modificaciones enzimáticas aportan a la formación de péptidos de piroglutamil. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 42.355.	(28)
F: GO: 0004784 Actividad de superóxido dismutasas (SOD)	Las SOD son enzimas con un papel importante en la protección contra especies tóxicas reducidas. Se ha propuesto que las SOD son importantes en la tolerancia de las plantas a la sequía. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 37.692.	(91)
P: GO: 0016567 Ubiquitinación de proteínas	Se ha encontrado evidencia de que la ubiquitinación tiene un rol clave en regular las respuestas de las plantas al estrés hídrico. La conjugación de un pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO por sus siglas en inglés) con proteínas diana se ve aumentado en respuesta a diversos factores de estrés, entre ellos la sequía y el calor. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 36.099.	(58)
F: GO: 0004386 Actividad de la helicasa	Se han encontrado helicasas de ARN involucradas en la respuesta celular al estrés abiótico de sequía. 6/18 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 34.836.	(76)

F: GO: 0008168 Actividad metiltransferasa	Plantas transgénicas de Arabidopsis expresaron genes de glicina sarcosina metiltransferasa (ApGSMT) y dimetilglicina metiltransferasa (ApDMT) de cianobacterias halotolerantes con una mayor tolerancia a la sequía, demostrando el uso de estos genes en mejorar la tolerancia al estrés abiótico. 19/19 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 33.721.	(93)
F: GO: 0003924 Actividad de GTPasa	En un estudio se identificaron nueve proteínas de unión a la molécula guanósín trifosfato (GTP), seis de las cuales eran únicas bajo condiciones de sequía extrema. 6/6 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 27.861.	(61)
F: GO: 0004013 Actividad adenosilhomocisteinasa	Varias enzimas importantes en el ciclo de la A-adenosil-L-metionina (SAM) se vieron aumentadas en hojas en respuesta al estrés por sequía, incluida la S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa. 13/13 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 25.385.	(112)
P: GO: 0033396 Proceso biosintético de beta-alanina a través de la vía 3-ureidopropionato	Se ha reportado que el aminoácido β -alanina posee funciones importantes en la fisiología y el metabolismo de las plantas, como un compuesto de defensa para resistir a condiciones como la sequía y la hipoxia. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 23.150.	(79)
C: GO: 0009512 Complejo de citocromo b6f	La expresión del complejo citocromo b6f se redujo en un 50% en respuesta a la sequía. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 22.738.	(50)
C: GO: 0000124 Complejo SAGA	SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa) es un complejo coactivador transcripcional que regula varios procesos celulares. Sus diferentes miembros tienen un rol clave en la respuesta al estrés ambiental, donde la expresión génica de algunos de sus componentes es inducido por una concentración alta de sal y alta temperatura. 5/5 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 21.052.	(66)
F: GO: 0046982 Heterodimerización de proteínas	La heterodimerización podría potenciar la actividad transcripcional de proteínas NAC, con un efecto sobre la expresión de genes diana y sobre la respuesta al estrés. 5/5 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 21.052.	(83)
F: GO: 0005516 Unión de calmodulina	Las proteínas de unión a calmodulina están involucradas en las respuestas al estrés biótico y abiótico. La sobreexpresión de estas proteínas causó una mayor expresión de genes de defensa y una mayor tolerancia al estrés por sequía.	(110)

	106/106 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 20.061.	
F: GO: 0004450 Actividad de isocitrato deshidrogenasa (NADP +)	Un estudio mostró que una isocitrato deshidrogenasa fue inducida por salinidad y estrés por sequía. 2/2 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 19.664.	(55)
P: GO: 0045489 Proceso biosintético de la pectina	Se ha evidenciado que las pectinas metilesterasa y los inhibidores de la pectina metilesterasa tienen roles importantes en responder a diversas señales internas y estrés ambiental por medio de la modificación de la pectina y la remodelación de la estructura de la pared celular. El metanol como subproducto de la reacción de esterificación metílica de la pectina, podría influir en la expresión de genes sensibles a la sequía/frío provocando la cascada de transducción de señales de la resistencia al estrés de las plantas. 8/8 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 18.959.	(116)
P: GO: 0090502 Hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN	Se han indicado que los sitios de hidrolisis de fosfolípidos identificados en plantas que podrían estar involucrados en respuestas al estrés hiperosmótico. 2/2 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 17.627.	(43)
F: GO: 0003924 Actividad de ATPasa	La regulación de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática se asocia con las respuestas fisiológicas de las plantas de té a la sequía y rehidratación posterior. 10/32 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 20.909.	(119)
F: GO: 0003779 Unión de actina	El citoesqueleto de actina vegetal tiene implicancias en varios procesos celulares, donde se incluye la respuesta al estrés. 2/2 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 16.765.	(45)
P: GO: 0005975 Proceso metabólico de carbohidratos	Se encontró que las enzimas metabólicas de carbohidratos podrían tener un rol en el mejoramiento y selección de genotipos de trigo con mayor resistencia a la sequía. 3/5 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 16.470.	(95)
F: GO: 0003935 Actividad de GTP ciclohidrolasa II	En un estudio, la regulación positiva específica en la biosíntesis de riboflavina (GTP ciclohidrolasa II) se asoció con la detección de sequía y la regulación de muchas enzimas degradantes que actúan sobre los carbohidratos de la pared celular, ácidos grasos y proteínas bajo estrés por sequía. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW.	(117)

	SNP 14.280.	
P: GO: 0005991 Proceso metabólico de la trehalosa	En plantas, se ha demostrado el rol clave de la trehalosa en la tolerancia al estrés, específicamente a la sequía para especies criptobióticas como <i>Selaginella lepidophylla</i> (Hook. & Grev.) Spring. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 13.968.	(34) y (49)
P: GO: 0000165 Cascada MAPK	Estudios moleculares y bioquímicos indican que las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) de las plantas tienen un papel importante en responder a estrés bióticos y abióticos incluidos la salinidad y sequía. 1/1 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 13.015.	(118)
F: GO: 0020037 Enlace de hemo	Se ha propuesto que la rama hemo de la vía biosintética del tetrapirrol posee un rol clave en la mediación de la señalización del estrés por sequía intracelular y en la estimulación de la desintoxicación de ROS bajo estrés por sequía. 3/3 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 11.979.	(70)
F: GO: 0044183 Chaperona de plegamiento de proteínas	Es conocido que las chaperonas se expresan en respuesta a condiciones de estrés ambiental como calor, frío y sequía, entre otros. 4/4 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 11.631.	(109)
F: GO: 0004332 Actividad de la fructosa-bisfosfato aldolasa	Resultados indican que es un gen denominado fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa desempeña un rol clave en la mejora de la capacidad de supervivencia de <i>Sesuvium portulacastrum</i> (L.) en condiciones de sequía y alta salinidad. 21/21 SNPs bajo equilibrio HW. SNP 4.576.	(25)

APÉNDICE V.

A continuación, se presentan las rutas completas para funciones, componentes y procesos biológicos analizados de 20.466 contig:

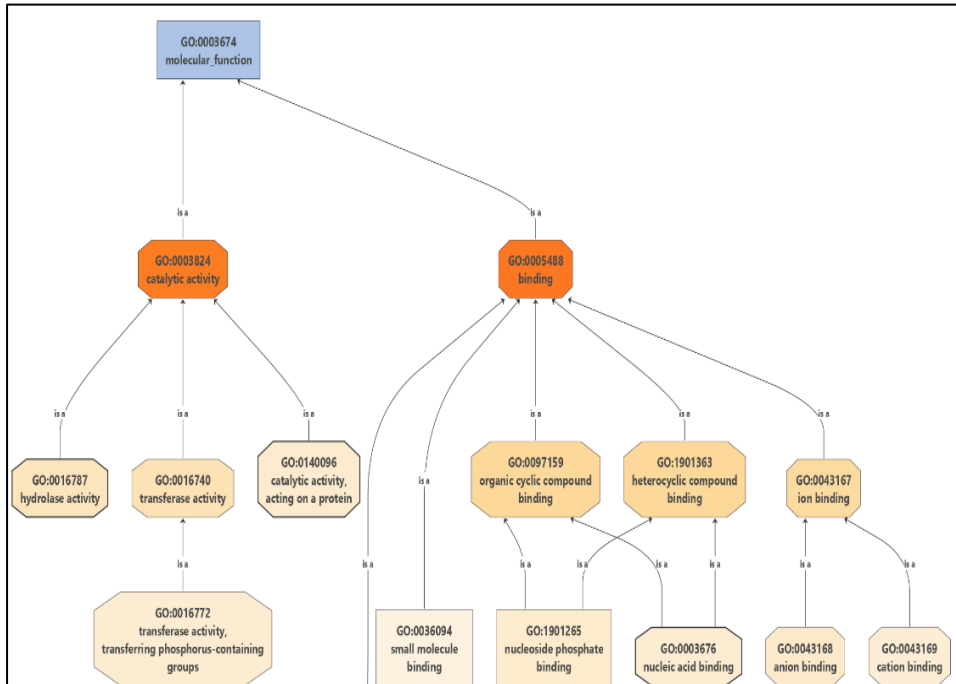


Figura 18. Rutas metabólicas de funciones moleculares (1).

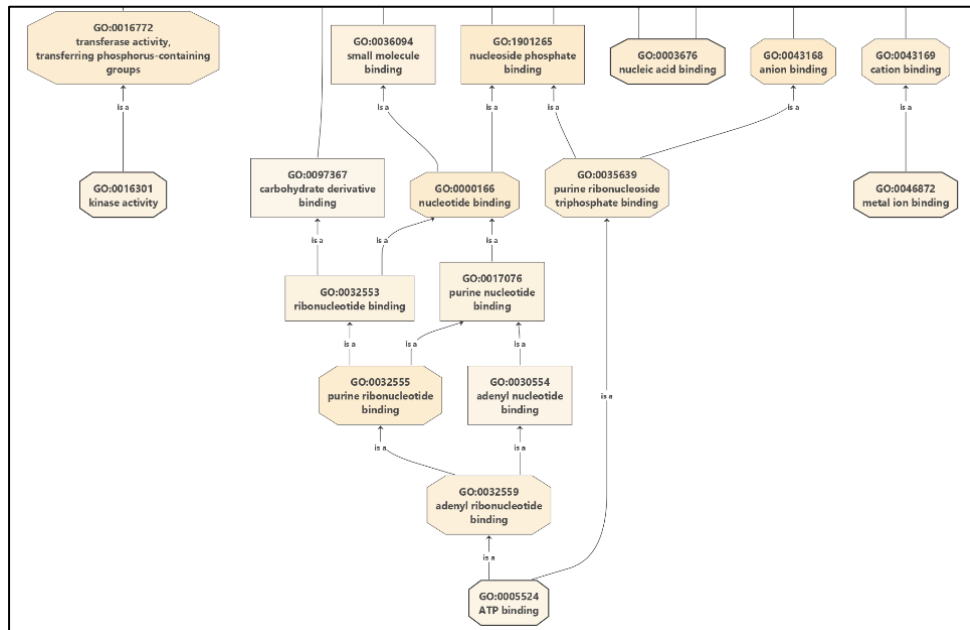


Figura 19. Rutas metabólicas de funciones moleculares (2).

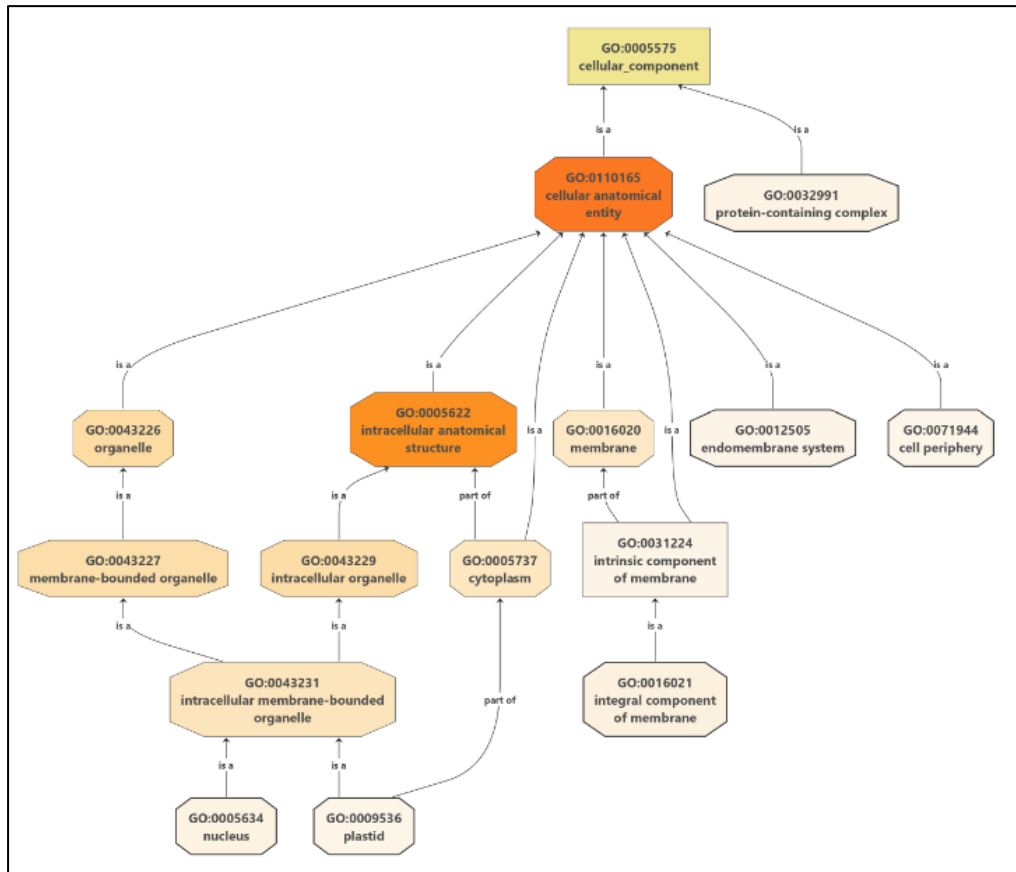


Figura 20. Rutas metabólicas de componentes celulares.

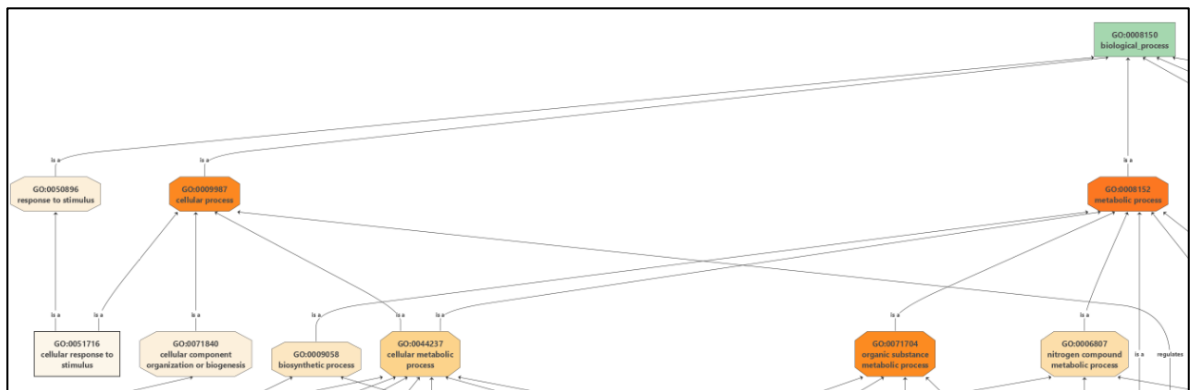


Figura 21. Rutas metabólicas de procesos biológicos (1).

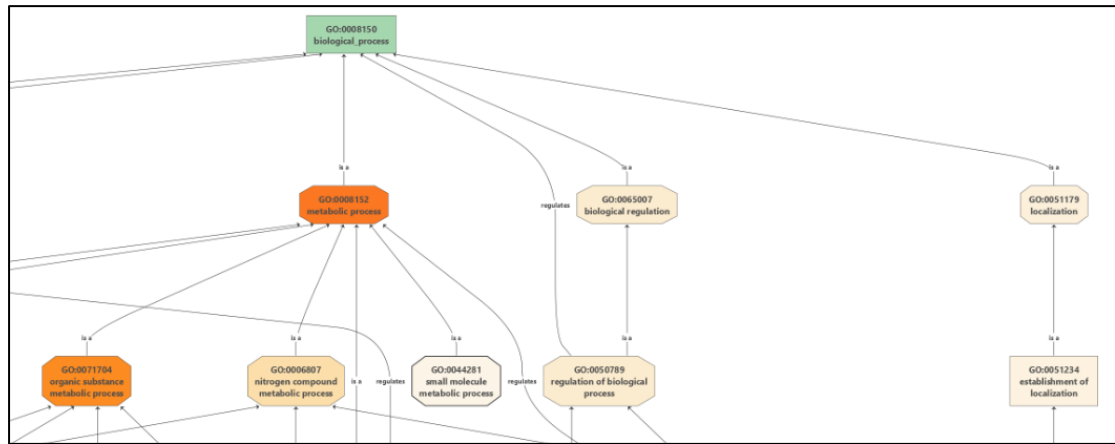


Figura 22. Rutas metabólicas de procesos biológicos (2).

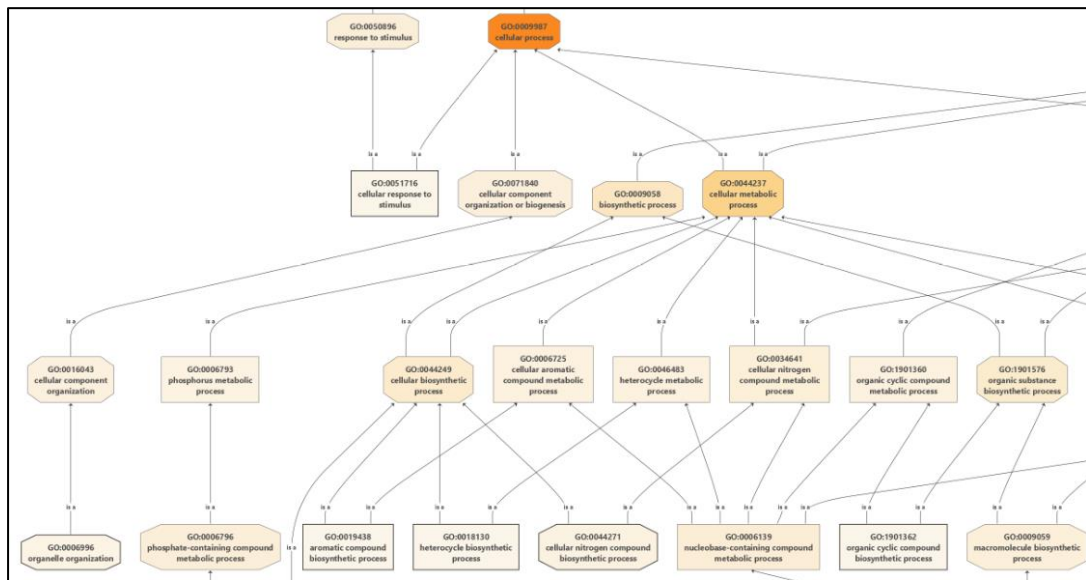


Figura 23. Rutas metabólicas de procesos biológicos (3).

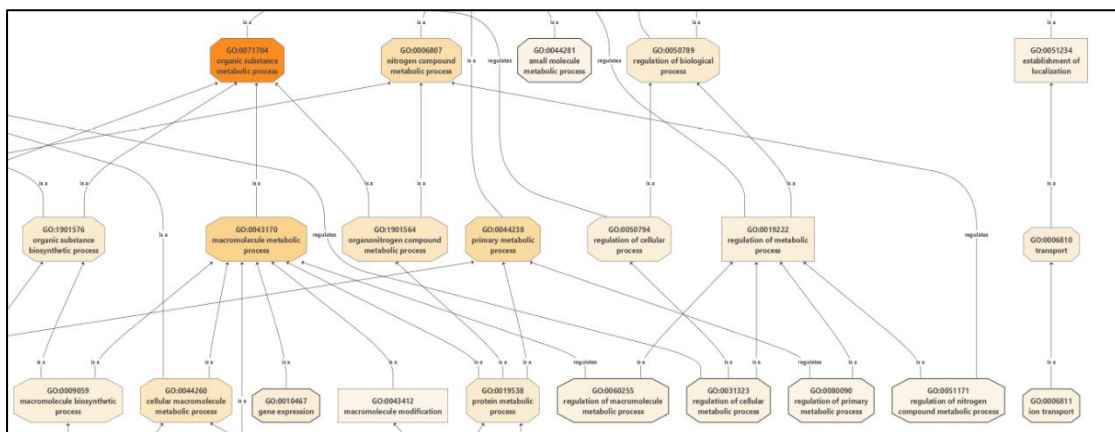


Figura 24. Rutas metabólicas de procesos biológicos (4).

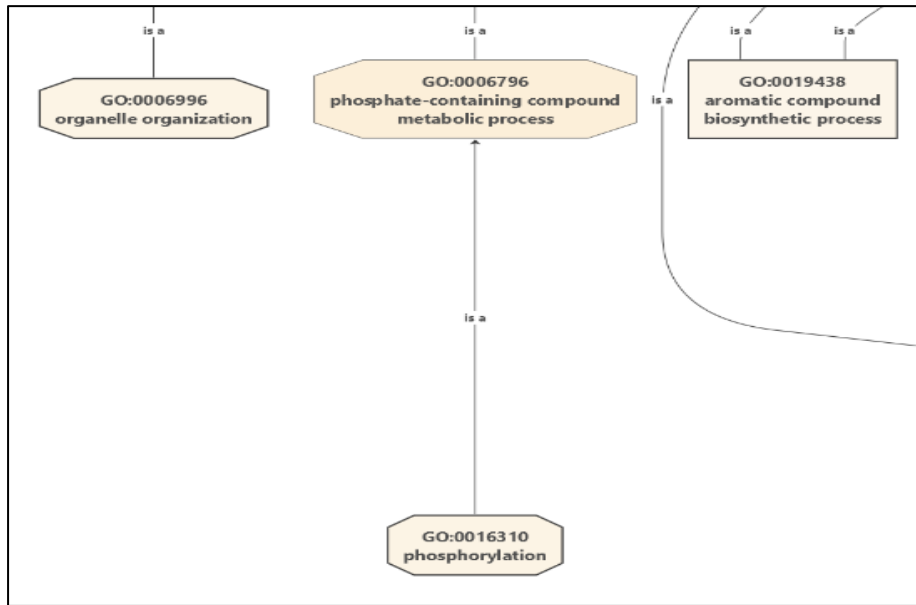


Figura 25. Rutas metabólicas de procesos biológicos (5).

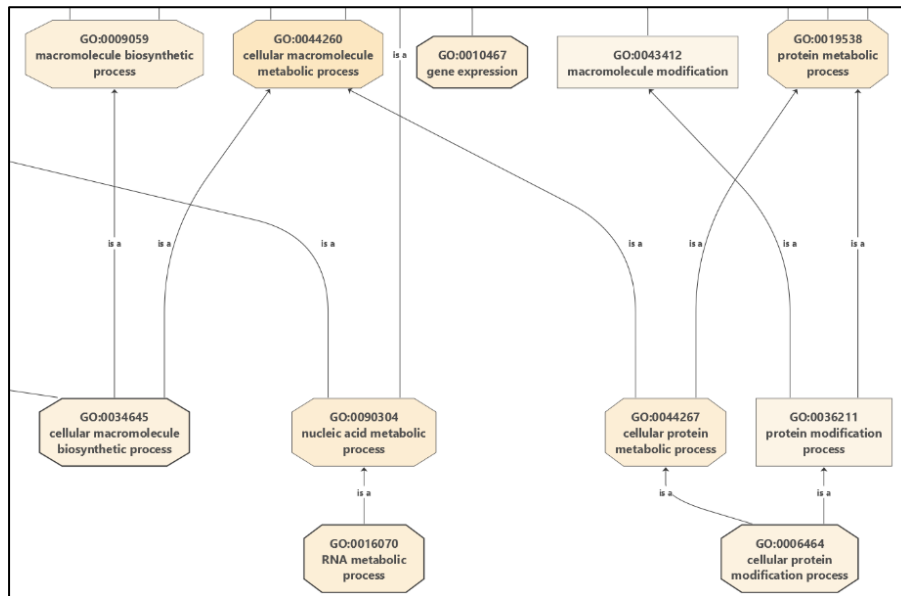


Figura 26. Rutas metabólicas de procesos biológicos (6).