



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**ANALISIS DEL ESTADO DE METILACION DE GENES EN CEREZO (*Prunus
avium*) PARA DIFERENCIAR ENTRE VARIEDADES DE COSECHA
TEMPRANA Y TARDIA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de
Ingeniera en Biotecnología Vegetal

POR: Francisca Mendoza Farías

Profesor Guía: Dr. Rodrigo Hasbún Zaror

Marzo, 2025

Concepción, Chile

© 2025, Francisca Mendoza Farias

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

ANALISIS DEL ESTADO DE METILACION EN ISLAS CpG DE GENES EN
CEREZO (*Prunus avium*) PARA DIFERENCIAR ENTRE VARIEDADES DE
COSECHA TEMPRANA Y TARDIA.

Profesor Guía



Rodrigo Hasbún Zaror

Profesor Asociado

Ingeniero Forestal, Dr.

Profesor Guía

Herman Silva Ascencio

Colaborador Externo

Bioquímico, Ph.D.



Profesora Guía

Ariana Bertín Benavides

Colaboradora Académica

Bióloga Marina, Dra.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero que brindo el proyecto Fondecyt Regular 1200718 de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile.

Además, agradezco el apoyo constante de mis compañeros y profesores de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	11
II. METODOLOGÍA	20
2.1 Adquisición y Utilización de Datos	20
2.2 Selección de Genes y Regiones Candidatas	21
2.3 Diseño de partidores y amplificación de los sitios de interés	22
2.4 Inmunoprecipitación de ADN Metilado (MeDIP)	23
2.4.1 Fragmentación del ADN	24
2.4.2 Preparación matriz de trabajo	24
2.4.3 Inmunoprecipitación del ADN Metilado	25
2.4.4 Purificación del ADN	26
2.5 Análisis ADN metilado	26
III. RESULTADOS	28
3.1 Selección de Genes y Regiones Candidatas	28
3.2 Prueba de partidores específicos.	30
3.3 Estandarización del Proceso de Sonicación	31
3.4 Análisis qPCR ADN metilado	33
IV. DISCUSIÓN	36
V. CONCLUSIONES	42
VI. GLOSARIO	43
VII. BIBLIOGRAFIA	48
VIII. APÉNDICE	54

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla	Página
Tabla 2.1. Resumen fechas de recolección correspondientes para cada variedad de <i>P. avium</i> y estadio en escala BBCH.....	20
Tabla 3.1. Características de los 10 genes candidatos con información del largo en pares de base de la secuencia de los genes asociados en un contexto de ADNg y ADNc, largo del ARN del gen anotado en la base de datos NCBI en <i>P. avium</i> , % cobertura de bases alineadas entre el ADNc de los genes candidatos y sus referencias correspondientes de NCBI, Query, Score e Identidad de la alineación por BLAST en NCBI.	29
Tabla A2. Lista de partidores diseñados para cada DMR, se incluye la secuencia, la Tm (C°), porcentaje GC y el nombre del gen correspondiente	55

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

N° Figura	Página
Figura 3.1. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red mostrando los amplicones obtenidos mediante PCR para cada par de partidores dirigidos a las regiones diferencialmente metiladas (DMRs). Las muestras corresponden a la variedad C14 de <i>P. avium</i> . El marcador de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.	30
Figura 3.2. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red mostrando los amplicones obtenidos mediante PCR para comparar la uniformidad de tamaño de estos dependiendo de las variedades (C14, C40, Kordia y Regina). El marcador de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.	31
Figura 3.3. Gel de agarosa al 1% teñido con gel red mostrando los resultados de distintas cantidades de pulsos de sonicación hechos a una muestra de ADN de cereza (Lapins), para observar el tamaño de corte resultante. El marcador de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.	33
Figura 3.4. Curvas de amplificación obtenidas mediante qPCR utilizando EvaGreen como colorante, comparando ADN metilado inmunoprecipitado (curvas negras) y ADN no tratado (curvas rojas) en cuatro variedades de cereza. Cada subfigura representa una variedad específica: (A) Royal Dawn (C14), (B) Royal Lee (C40), (C) Kordia (KOR), y (D) Regina (REG). En cada subfigura se incluyen tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas, para un total de nueve curvas por condición (tratado y no tratado). El eje X muestra el número de ciclos de amplificación, mientras que el eje Y representa el valor reportero normalizado (Rn).	34
Figura 3.5. Gráfico boxplot que compara el porcentaje de ADN metilado con relación al ADN total. Las variedades C14 (Royal Dawn), C40 (Royal Lee), KOR (Kordia) y REG (Regina) incluyen tres réplicas biológicas (A, B y C), excepto Regina, que tiene solo dos réplicas (REGB y REGC), además de tres réplicas técnicas por réplica biológica (N=3).	35
Figura A.1. Vista de dos DMRs (DMR 6 y DMR 10) desde IGV. En amarillo se destaca la metilación diferencial entre las variedades tempranas (C14 y C40) y las variedades tardías (Kordia y Regina). En naranja se destaca el gen candidato correspondiente a la DMR.	54

RESUMEN

En Chile, la exportación de frutos de *Prunus avium* (cerezo dulce) depende significativamente de la época y duración del desarrollo y maduración de los frutos. Dentro de esta especie, las variedades se pueden clasificar según sus fechas de cosecha en tempranas, media estación o tardías. Esta diversidad fenológica ha favorecido la comercialización interna y externa, destacando la importancia de comprender y predecir estos rasgos de manera temprana para optimizar las plantaciones. Recientes estudios han sugerido que las modificaciones epigenéticas, en particular la metilación de la citosina, están vinculadas con la fecha de desarrollo y maduración del fruto. Además, el análisis de los metilomas permite detectar "epi-marcadores" que podrían predecir rasgos fenológicos específicos, aunque esta área de investigación aún es poco explorada. En esta investigación, se analizó el metiloma de cuatro variedades de *P. avium* (dos variedades tempranas y dos tardías) para identificar regiones génicas diferencialmente metiladas (DMRs). El análisis bioinformático de la metilación *in silico* se complementó con la validación experimental de una DRM mediante inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP) seguida de PCR cuantitativa. Los resultados revelaron 10 genes candidatos cercanos a DMRs cuya función podría relacionarse con el desarrollo del fruto. El procedimiento de validación experimental permitió identificar indicios de diferencias específicas de metilación entre variedades, aunque estas

no fueron tan pronunciadas como se esperaba. Los resultados sugieren la necesidad de optimizar el protocolo para fortalecer la robustez y claridad de las evidencias obtenidas.

ABSTRACT

In Chile, the export of *Prunus avium* (sweet cherry) fruits significantly depends on the timing and duration of fruit development and ripening. Within this species, varieties can be classified based on their harvest dates as either early, mid-season or late. This phenological diversity has facilitated domestic and international commercialization, highlighting the importance of understanding and predicting these traits early to optimize orchard management. Recent studies have suggested that epigenetic modifications, particularly cytosine methylation, are linked to fruit development and ripening timing. Additionally, methylome analysis allows the identification of "epi-markers" that could predict specific phenological traits, although this field remains largely unexplored. In this study, the methylome of four *P. avium* varieties (two early and two late) was analyzed to identify differentially methylated regions (DMRs). Bioinformatic analysis of *in silico* methylation was complemented by the experimental validation of a DMR using methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) followed by quantitative PCR. The results revealed 10 candidate genes near DMRs whose functions may be related to fruit development. The experimental validation procedure allowed the identification of indications of specific methylation differences between varieties, although these differences were less pronounced than expected. The results highlight the need to optimize the protocol to improve the robustness and clarity of the evidence obtained.

I. INTRODUCCIÓN

La existencia de distintas necesidades del mercado agrofrutícola ha repercutido en el desarrollo o descubrimiento de diversas variedades dentro de las especies frutales. Estas necesidades van más allá de las características intrínsecas del fruto, como el tamaño, color y sabor, sino que también abarcan aspectos relacionados con los procesos productivos, tales como la fecha óptima de cosecha, la vida de postcosecha o la capacidad de almacenamiento. Entre estas características, la fecha de cosecha es de particular relevancia, ya que tiene un impacto significativo en los procesos de recolección y exportación.

El desarrollo y la maduración de los frutos es un proceso complejo que se produce a múltiples niveles y está regulado por una serie de factores. Desde el punto de vista ambiental, este proceso está fuertemente influenciado por las horas de frío acumuladas antes del inicio de la primavera, estas condiciones climáticas son cruciales para iniciar y mantener el desarrollo del fruto (Alburquerque et al., 2008). Internamente, el proceso de desarrollo y maduración del fruto está regulado por una amplia red de mecanismos que incluyen cambios dinámicos de las hormonas auxina y citoquinina, entre otros (Kumar et al., 2014). Estos cambios hormonales también vienen acompañados

de un aumento en la codificación de enzimas responsables de múltiples modificaciones en el fruto, como el ablandamiento de la pulpa y la acumulación de azúcares (Bapat et al., 2010). Las complejas interacciones entre estos factores determinan, no sólo el momento de la maduración del fruto *per se*, sino también todos los aspectos relacionados, como la salida de la dormancia, la época de floración y la presentación de características físicas específicas en el fruto (Tang et al., 2020).

Debido a la importancia de los rasgos fenológicos en las especies de árboles frutícolas, múltiples investigaciones a lo largo de los años han aumentado la cantidad de información disponible sobre los rasgos, especialmente de los que están relacionados con la calidad del fruto y la mejora del rendimiento (Savadi et al., 2021). Los estudios han logrado identificar genes específicos y vías metabólicas clave implicadas en este proceso (Licciardello et al., 2023; Ming et al., 2023). Actualmente se dispone de múltiples genomas de referencia con anotaciones génicas para muchas especies e incluso variedades, lo que permite profundizar en la investigación del funcionamiento biológico de distintos rasgos, lo que conlleva implicaciones prácticas para el avance de los programas de mejora genética (Jahed & Hirst, 2023), un ejemplo aquello es la secuenciación y de los genomas de cuatro variedades de cerezo (Satonishiki, Tieton, Big Star y Hongmanao) que han permitido identificar variantes

asociadas a rasgos de calidad y resistencia, facilitando el entendimiento de su evolución y domesticación (Shirasawa et al., 2017; Pinosio et al, 2020).

Aunque generalmente se vincula la divergencia fenotípica observada en las variedades frutícolas con polimorfismos genéticos, en la actualidad no ha sido posible comprender completamente la variabilidad fenotípica a nivel molecular (Ball, 2013). Debido a esto, se ha empezado a analizar la diversidad epigenómica en poblaciones de especies vegetales para determinar si las diferencias epigenéticas pueden contribuir a la variabilidad fenotípica observada (Schmitz et al., 2013). Distintas investigaciones han concluido que es crucial ampliar el alcance de las investigaciones de la relación fenotipo-genotipo hacia la epigenética y así no caer en una presunción errónea de causalidad exclusiva de la genética en el fenotipo (Bretó et al., 2001; Róis et al., 2013).

Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de histonas, son cambios heredables en la expresión génica que no implican alteraciones en la secuencia del ADN, pero que regulan la expresión génica al modificar el estado de compactación de la cromatina (Agarwal et al., 2020). En el mejoramiento genético de frutales, estas modificaciones pueden ser utilizadas para regular genes clave que afectan características importantes como la maduración, el tamaño del fruto y contenido de azúcares (Ji & Wang, 2023). Por lo tanto, actualmente son consideradas

como una herramienta valiosa para el desarrollo y mejora de cultivos, debido a que podrían proporcionar una fuente novedosa de causalidad de la variabilidad fenotípica (Gallusci et al., 2017). En un estudio de Manning et al. (2006), encontraron un cambio fenológico distintivo gatillado por una hipermetilación de citosinas en la región promotora de un gen homólogo al SBP-box (SQUAMOSA promoter binding), el cual fue llamado LeSPL-CNR (*Lycopersicon esculentum* SQUAMOSA Promoter-Binding-Like, Colorless Non-Ripening), el cual produce una variante de tomates incoloros e inmaduros. Este cambio radical del fenotipo causado por una epimutación específica es considerado como un ejemplo de epialelos.

Los epialelos son variantes epigenéticas de un mismo alelo, caracterizadas por diferencias en la metilación del ADN o modificaciones de histonas, que resultan en diferentes patrones de expresión génica. Lograr encontrar y estudiar epialelos, epimutantes o epigenomas es parte del proceso para llegar a usar tecnologías más avanzadas en el futuro como la edición/manipulación de epigenomas que abriría nuevas rutas para el futuro de la agricultura (Tang et al., 2020). Siguiendo el estudio de Manning et al. (2006) se destaca que la modificación epigenética presente es la metilación de la citosina, también conocida como 5-metilcitosina. Este mecanismo está ampliamente estudiado en otras especies vegetales como tomate (*Solanum lycopersicum*), frutilla (*Fragaria* × *ananassa*) y naranjo dulce (*Citrus* × *sinensis*) (Tang et al., 2020).

En el caso de la cereza (*Prunus avium*), la consideración de la fecha de cosecha es crucial, principalmente debido a las exigencias del mercado asiático. China recibe entre el 88 y 91% de todas las cerezas exportadas desde Chile desde el año 2018. En la temporada 2021/2022 Chile exportó a China un total de 311.167 toneladas de cerezas, que corresponden a un valor total de USD 1.700 millones FOB (Reyes, 2022). La demanda es particularmente alta durante la celebración del Año Nuevo Chino, cuando el precio puede llegar a un máximo de 13 USD/kg. (Reyes, 2022). Sin embargo, este negocio conlleva un desafío no menor, ya que la fecha del año nuevo chino no es estática, sino que su celebración depende de la fase de luna nueva, la que puede ocurrir entre el 21 de enero y el 20 de febrero. Esta circunstancia requiere una planificación meticulosa y esfuerzos considerables para asegurar que los frutos lleguen a su destino en el momento preciso. Por esto, la fecha de maduración y recolección es de suma importancia para la especie, siendo incluso una característica de clasificación importante dentro de las múltiples variedades disponibles hoy en día, donde dependiendo de la diferencia de tiempo que pasa entre la maduración de una variedad estándar como Bing, los cultivares se pueden clasificar como “tempraneros” y “tardíos” (Ellena, 2006). Gracias a que se cuenta con una amplia gama de fechas de cosecha, es posible extender la temporada de producción, reducir el riesgo climático, y optimizar el uso de recursos. Además, facilita el acceso a mercados específicos y la adaptación a

distintas zonas geográficas, lo que incrementa la rentabilidad y seguridad para los productores.

En este contexto, investigaciones recientes han demostrado cómo la regulación hormonal, los factores genéticos y los mecanismos epigenéticos influyen en la sincronización de la maduración y la calidad del fruto del cerezo. El ácido abscísico (ABA) y el ácido giberélico (GA3) han sido identificados como reguladores clave que afectan directamente la acumulación de antocianinas y el cambio de color, procesos que son determinantes en la clasificación de cultivares según su maduración temprana o tardía (Kuhn et al., 2021a; Kuhn et al., 2021b). Asimismo, se ha identificado que los ARNs largos no codificantes (lncRNAs, por su nombre en inglés Long non-coding RNAs) desempeñan un papel crítico en la regulación espaciotemporal de los genes relacionados con la maduración, dirigiendo procesos como la biosíntesis de antocianinas, el metabolismo del ABA y la desintegración de la pared celular. Estos lncRNAs forman módulos regulatorios que controlan la expresión de genes clave, como MYBs, bHLHs (basic helix-loop-helix) y WD40s, integrándose en la red regulatoria de la maduración del fruto del cerezo (Liu et al., 2024).

También se ha podido investigar la correlación entre la variabilidad genética, la epigenética y la fenotípica, a través del uso de marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphism) y MSPA (methylation-sensitive amplified

polymorphism), Avramidou et al. (2021) destacan en sus resultados de análisis de correlación en poblaciones de cerezo de origen griego, que la diversidad epigenética tuvo un mayor impacto en los rasgos fenotípicos que la alta diversidad genética. Otros estudios como los de Narváez et al. (2022); Prudencio et al. (2018); Rothkegel et al. (2017) han logrado vincular esta misma modificación epigenética, con el estadio de dormancia y la salida de esta etapa, que es considerada como el inicio del proceso de desarrollo del fruto. No obstante, es importante recalcar que dichos cambios epigenéticos responden al desarrollo y no necesariamente a procesos hereditarios como los que determinan la presencia de epialelos. Estudios como estos son claves para dar a conocer la epigenómica como un área de estudio relevante que nos podría permitir el desarrollo de nuevas herramientas para la mejora de cultivos, si se logra avanzar en el entendimiento de la variabilidad y heredabilidad epigenética. (Springer & Schmitz, 2017). Los datos utilizados para esta tesis provienen de la secuenciación de 25,89 Gbases utilizando una única celda de flujo ONT donde se generaron 2,9 M de lecturas con una longitud media de 15,03 kb. Se realizó un análisis de la metilación diferencial basado en los datos de la ONT, utilizando un script Perl personalizado o filtros de Excel. Lo que permitió el estudio de zonas específicas del genoma y llevó a la identificación de las DMRs estudiadas.

En base a lo expuesto anteriormente se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen diferencias en el estado de metilación en regiones codificantes o cercanas a genes relacionados con el desarrollo del fruto que puedan ser utilizadas como marcadores epigenéticos para diferenciar variedades de *Prunus avium* de cosecha temprana y tardía?

- **Hipótesis nula (H_0):**

Las regiones diferencialmente metiladas entre variedades de cosecha temprana y tardía de *Prunus avium* no pueden ser transformadas en marcadores epigenéticos de análisis dirigido y simple.

- **Hipótesis alternativa (H_a):**

Al menos una región diferencialmente metilada entre variedades de cosecha temprana y tardía de *Prunus avium* puede ser transformada en un marcador epigenético de análisis dirigido y simple.

Objetivo General:

Analizar el estado de metilación en regiones codificantes o cercanas a genes relacionados con el desarrollo del fruto de *Prunus avium* para desarrollar marcadores epigenéticos que permitan diferenciar entre variedades de cosecha temprana y tardía.

Objetivos Específicos:

- Identificar regiones diferencialmente metiladas ubicadas en zonas codificantes o cercanas a genes entre variedades de cosecha temprana y cosecha tardía de *P. avium* mediante un análisis *in silico* para el diseño de partidores que funcionen transversalmente entre las variedades.
- Validar experimentalmente los niveles de metilación diferencial en las regiones seleccionadas estudiadas *in silico* mediante la técnica de inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDip) para determinar su potencial como marcadores epigenéticos reproducibles.

II. METODOLOGÍA

2.1 Adquisición y Utilización de Datos

Todos los análisis en este estudio se basan en datos genómicos y epigenómicos obtenidos a partir de la secuenciación de ADN de muestras de frutos que representan cuatro variedades de *P. avium*. Estas muestras se recopilaron como parte del proyecto FONDECYT regular N° 1200718. La extracción de ADN se realizó en las variedades C14 (Royal Dawn), C40 (Royal Lee), Kordia y Regina, siendo las dos primeras clasificadas como "variedades de cosecha temprana" y las dos últimas como "variedades de cosecha tardía" (Tabla 2.1). Se empleó el kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) para la extracción de ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2.1. Resumen fechas de recolección correspondientes para cada variedad de *P. avium* y estadio en escala BBCH.

Variedades	Recolección BBCH 71	Recolección BBCH 81	Recolección BBCH 87
Royal Dawn (C14)	21-30 septiembre	11-20 octubre	1-10 noviembre
Royal Lee (C40)	21-30 septiembre	11-20 octubre	1-10 noviembre
Kordia	21-30 octubre	21-30 noviembre	1-10 diciembre
Regina	21-30 octubre	21-30 noviembre	1-10 diciembre

Según escala BBCH: 71 fruto tiene un tamaño del 10% de su tamaño final; 81 fruto empieza a presentar color; 87 fruto empieza a ablandarse.

La secuenciación del genoma completo se llevó a cabo utilizando PromethION, un sistema de secuenciación de nueva generación de alto rendimiento de Oxford Nanopore Technology, en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin (EE. UU.). La llamada de bases se realizó utilizando el modelo Megalodon v.2.4.2., alineando secuencias con el genoma de *P. avium* (Shirasawa et al., 2017) y con los parámetros estándar de Oxford Nanopore. Los genomas ensamblados de las cuatro variedades se visualizaron en el software Integrative Genomics Viewer (IGV) con perfiles de metilación para su análisis comparativo (Robinson et al., 2017).

2.2 Selección de Genes y Regiones Candidatas

Los datos de coordenadas de citosinas con niveles diferenciales de metilación entre las variedades de cosecha temprana y tardía se organizaron y visualizaron en Excel. Para identificar grupos de citosinas cercanas que pudieran considerarse como islas CpG, se calculó la distancia entre posiciones genómicas al restar las coordenadas adyacentes, y se aplicaron reglas de formato condicional que resaltaron aquellas con distancia menor a 200 pb (con énfasis en distancias < 50 pb). Esto permitió detectar zonas con alta densidad de metilación divergente. En estas regiones se examinó la cercanía a genes homólogos alineados en el área y se seleccionaron como DMR candidatas

aquellas que presentaban conjuntos de citosinas diferencialmente metiladas dentro de exones o en la región río arriba correspondiente a promotores putativos. Los genes asociados a las DMR candidatas fueron comparados con bases de datos genéticas, específicamente con información de los genomas anotados de *P. avium* y especies filogenéticamente relacionadas. La selección final de genes candidatos se realizó considerando aquellos que mostraran un alto porcentaje de identidad (>80%) y una cobertura superior al 70% en la secuencia de consulta. Además, se priorizaron genes con un puntaje SCORE mayor a 200, indicando un alto grado de similitud. Finalmente, se verificó que los genes seleccionados estuvieran anotados y fueran identificables como ortólogos en otras especies, para asegurar su relevancia biológica.

2.3 Diseño de partidores y amplificación de los sitios de interés

El diseño de partidores se llevó a cabo utilizando diversas herramientas bioinformáticas, como PrimerQuest de IDT, Primer3Plus (Untergasser et al., 2012), Multiple Primer Analyzer de Thermo Fisher, PrimerBlast de NCBI (Ye et al., 2012) y PCR Primer Stats de Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000), buscando producir partidores que amplificaran un amplicón de un tamaño entre 100 y 200 pares de bases. Los partidores fueron diseñados considerando los siguientes parámetros: contenido de GC entre 40-60%, temperatura de fusión o

T_m entre 50° y 65° Celsius, una diferencia de T_m entre el partidor para la cadena sentido (forward) y para la cadena antisentido (reverse) de la misma pareja sea <5° C, el mismo número de nucleótidos para ambos oligos de la pareja, ausencia de estructuras secundarias (como hairpin, auto-complementariedad o complementariedad entre partidores) y especificidad para la región que se busca amplificar.

Los partidores fueron probados utilizando el ADN extraído de las cuatro variedades a través de PCR convencional utilizando 2 µL de ADN diluido 1:10 con agua de grado molecular para una concentración final de 100 ng, 1 U de Taq Platinum™ polimerasa libre de ADN, PCR buffer (-MgCl₂) libre de ADN x1, 2 mM MgCl₂, 0,2 Mm de dNTP mix, 0,1 mM por cada partidor correspondiente, 8 µm de seroalbúmina bovina (BSA) y agua de grado molecular para llegar al volumen de 20 µL.

2.4 Inmunoprecipitación de ADN Metilado (MeDIP)

Para la inmunoprecipitación de ADN metilado, se utilizó el Methylamp™ Methylated DNA Capture Kit de EpigenTek, siguiendo las instrucciones del fabricante. De este Kit provienen todos los reactivos usados, incluyendo los buffers MC1 a MC6, los anticuerpos, la proteinasa K, entre otros. Se procesaron

un total de 12 muestras, con tres réplicas biológicas por cada variedad estudiada, a una concentración promedio de 1000 ng de ADN total. Además, se incluyó una muestra con un anticuerpo IgG para el control negativo.

2.4.1 Fragmentación del ADN

Antes de la inmunoprecipitación, se realizó un procedimiento de estandarización para determinar las condiciones óptimas de fragmentación del ADN. Se utilizó ADN en la misma concentración y volumen que las muestras experimentales. La fragmentación se llevó a cabo mediante un procesador ultrasónico VCX130, utilizando 200 μ L de agua grado molecular y 1000 ng de ADN previamente precipitado con una mezcla de etanol absoluto y cloruro de potasio a una concentración final de 0,12 M. El procedimiento consistió en rondas de sonicación de 10 segundos a una amplitud del 20%, seguidas de pausas de 50 segundos. Todo el proceso se realizó sobre hielo para evitar variaciones bruscas de temperatura que pudieran degradar la muestra. Se evaluaron entre dos y ocho ciclos de sonicación, y los fragmentos de ADN obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1,3%, corrido a 80 voltios durante 30 minutos, para seleccionar las condiciones que producían fragmentos entre 200 y 1000 pares de bases.

2.4.2 Preparación matriz de trabajo

Por cada muestra a tratar, se preparó un pocillo especial para el tratamiento. A cada pocillo se le añadieron 100 μ L de buffer MC1. Para el control negativo, se agregó 1 μ L de IgG no inmune. Se añadió también 1 μ L de anticuerpo específico contra la 5-Metilcitosina. Los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante 60 minutos para permitir que los anticuerpos se adhirieran a estos. Una vez completada la incubación, se procedió a la fragmentación del ADN. El ADN se sonicó en las condiciones previamente estandarizadas, y posteriormente se incubó a 95°C durante dos minutos para asegurar una correcta desnaturalización. El ADN se enfrió inmediatamente en hielo. Además, se reservaron 5 μ L del ADN sonicado para su uso en controles de calidad.

2.4.3 Inmunoprecipitación del ADN Metilado

Se eliminaron los buffers no específicos de los pocillos, realizando lavados con 150 μ L de MC1 y MC3. Luego, se añadieron 100 μ L del ADN sonicado a cada pocillo y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente durante 90 a 120 minutos en un agitador orbital, manteniendo la mezcla a 50-100 rpm. Este paso permitió que el ADN metilado se uniera específicamente a los anticuerpos adheridos en los pocillos. Una vez concluida la incubación, el sobrenadante fue eliminado, y los pocillos fueron lavados tres veces con 150 μ L de MC3 para asegurar la eliminación de ADN no específico.

2.4.4 Purificación del ADN

Para la liberación del ADN metilado de los complejos de anticuerpo, se preparó una mezcla de buffer MC4 con proteinasa K. Se añadieron 60 μ L de esta mezcla a cada pocillo, incluidas las muestras reservadas de ADN sin tratar, y se incubaron a 65°C en un baño de agua durante 60 minutos. Posteriormente, se prepararon las columnas de centrifugado añadiendo 100 μ L de MC5. Las muestras se mezclaron con etanol al 100% y se transfirieron a las columnas de purificación. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 segundos y se realizaron dos lavados sucesivos con etanol al 90%, asegurando la eliminación de contaminantes. Finalmente, el ADN purificado se eluyó añadiendo 20 μ L de buffer MC6 directamente en la columna y centrifugando nuevamente a 12000 rpm. El ADN metilado obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso en análisis posteriores.

2.5 Análisis ADN metilado

Se utilizó PCR en tiempo real para amplificar las DMR y determinar su presencia en las muestras tratadas con inmunoprecipitación y las no tratadas. Se utilizó 3 μ L de ADN diluido 1:3, 1X de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), 0,125 mM por cada partidor correspondiente y agua libre de nucleasas para llegar al volumen de 10 μ L. El programa de qPCR fue (i) 95°C por 12 minutos, 40 ciclos de (ii) 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos,

72°C por 20 segundos y para la curva de disociación (iii) 65°C a 95°C con incrementos de 0.5°C cada cinco segundos, con monitorización de la fluorescencia en cada incremento.

Para comparar los niveles de metilación entre las distintas muestras, se emplearon los valores umbral de ciclo (Ct) generados a partir de los datos de la qPCR. Estos valores fueron procesados mediante una fórmula matemática que permite estimar el porcentaje de metilación para las diferentes variedades. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{ MeDIP} / \text{Input total} = (Ct(\text{input}) - Ct(\text{MeDIP}))^2 \times 100$$

III. RESULTADOS

3.1 Selección de Genes y Regiones Candidatas

Se identificaron 33 DMRs entre las variedades tempranas y tardías de *P. avium*. De este conjunto, se priorizaron aquellas ubicadas en proximidad a genes, reduciendo la selección a 15 regiones que exhibían diferencias en los niveles de metilación en las áreas genómicas circundantes (Apéndice 1). Como resultado, se identificaron 10 genes candidatos asociados a estas DMRs, los cuales presentan diferenciación en los niveles de metilación entre las variedades tempranas y tardías. Además, estos genes están anotados y son identificables como ortólogos en otras especies (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Características de los 10 genes candidatos con información del largo en pares de base de la secuencia de los genes asociados en un contexto de ADNg y ADNc, largo del ARN del gen anotado en la base de datos NCBI en *P. avium*, % cobertura de bases alineadas entre el ADNc de los genes candidatos y sus referencias correspondientes de NCBI, Query, Score e Identidad de la alineación por BLAST en NCBI.

DMR	ADNg	ADNc	ARN ref.	% Cob.	Query	Score	Ident.	Descripción
1	1045	504	715	60,8	86,3	559	97,86	Protein TAB2 homolog, chloroplastic-like
2	1553	1206	1401	86,1	100,0	2484	100	Polygalacturonase-like
3	1344	759	1017	69,4	93,0	2176	100	Probable protein phosphatase 2C 55
4	1964	1839	1815	99,7	98,4	1905	100	Receptor-like protein 2
5	5019	1377	1970	69,9	100,0	1543	100	tRNA dimethylallyltransferase 9
6	1592	1593	1676	95	100,0	3999	100	Berberine bridge enzyme-like 17
7	3626	855	1104	77,4	100,0	927	94,48	Hypersensitive-induced response protein 1
8	4345	2391	2574	92,9	100,0	1154	97,93	RINT1-like protein MAG2L
9	2560	1056	1261	83,7	100,0	2251	100	GDSL esterase/lipase At5g22810
10	2740	945	1205	79,8	101,8	3274	100	Nudix hydrolase 20, chloroplastic-like

En orden: Bases de ADN genómico (ADNg), bases de ADN copia (ADNc), bases de ARN de gen anotado en NCBI (ARN ref.), porcentaje de cobertura del ADNc en

ARN ref. total (% cob.), porcentaje de ADNc alineado en ARN ref. (Query), puntaje total de la alineación (Score) y porcentaje de identidad de la alineación (Ident.)

3.2 Prueba de partidores específicos.

Una primera ronda de PCR convencional permitió determinar que partidores (Apéndice 2) se utilizarían para el resto de los experimentos. Se seleccionaron los partidores de las DMRs 1, 2, 3b y 5 ya que mostraron una amplificación eficiente, evidenciada por la presencia de amplicones de tamaño consistente entre las dos réplicas realizadas. (Figura 3.1)

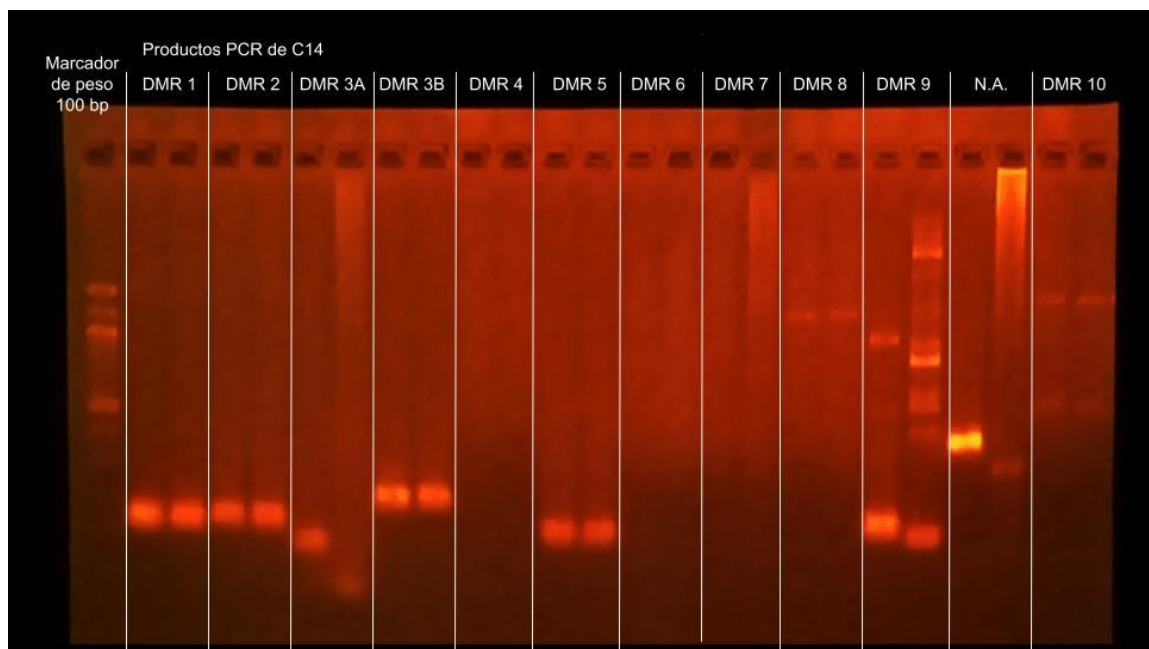


Figura 3.1. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red mostrando los amplicones obtenidos mediante PCR para cada par de partidores dirigidos a las regiones diferencialmente metiladas (DMRs). Las muestras corresponden a la variedad C14 de *P. avium*. El marcador de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.

Una segunda prueba se llevó a cabo para verificar que el producto de estas DMRs es estable con todas las muestras. Los resultados obtenidos fueron positivos en las cuatro variedades (Figura 3.2).

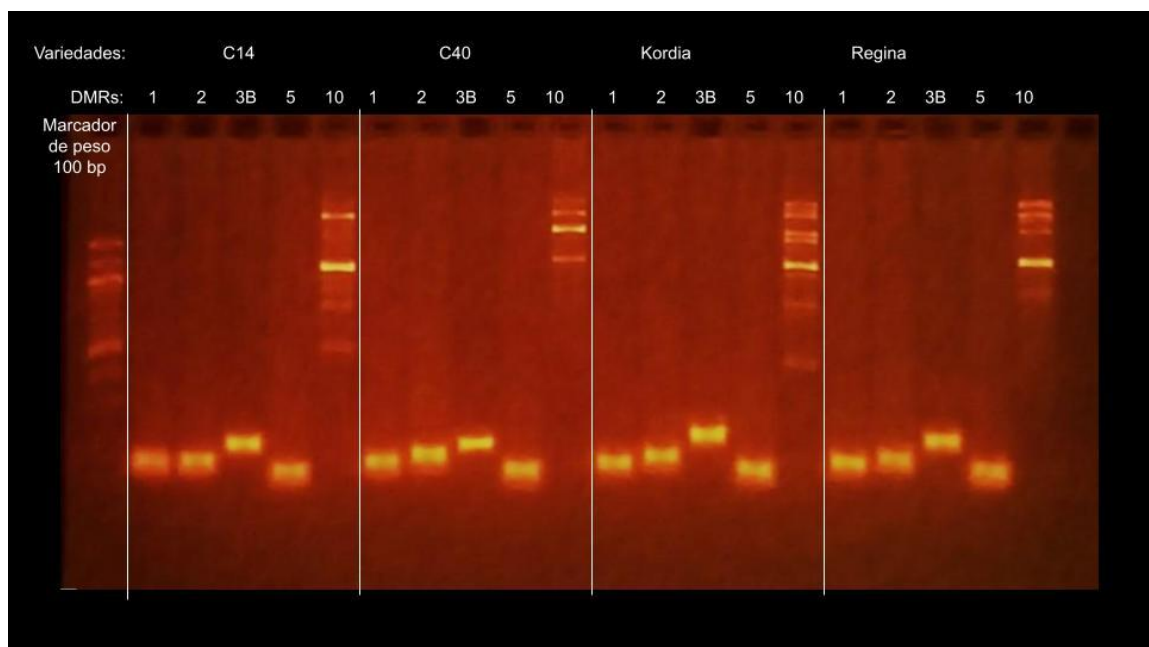


Figura 3.2. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red mostrando los amplicones obtenidos mediante PCR para comparar la uniformidad de tamaño de estos dependiendo de las variedades (C14, C40, Kordia y Regina). El marcador de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.

3.3 Estandarización del Proceso de Sonicación

En la evaluación de múltiples configuraciones para determinar las condiciones óptimas para la fragmentación del ADN, se pudo observar cómo afectaba la

cantidad de pulsos a la integridad de la muestra. En las condiciones iniciales de dos o tres pulsos, se observaron fragmentos predominantemente mayores a 1500 bp, indicando una fragmentación insuficiente. Mientras que después de los seis pulsos el tamaño de los fragmentos pareciera volverse consistente. Eso no significa que los pulsos dejaran de tener efecto, ya que podrían estar afectando al ADN de manera menos perceptible. Debido a que el tamaño ideal de fragmentación era de 200 a 1000 pares de base, se determinó finalmente que la configuración óptima consistía en seis pulsos de sonicación, cada uno de 10 segundos, seguidos por un periodo de reposo de 50 segundos, realizados de manera constante sobre hielo (Figura 3.3).

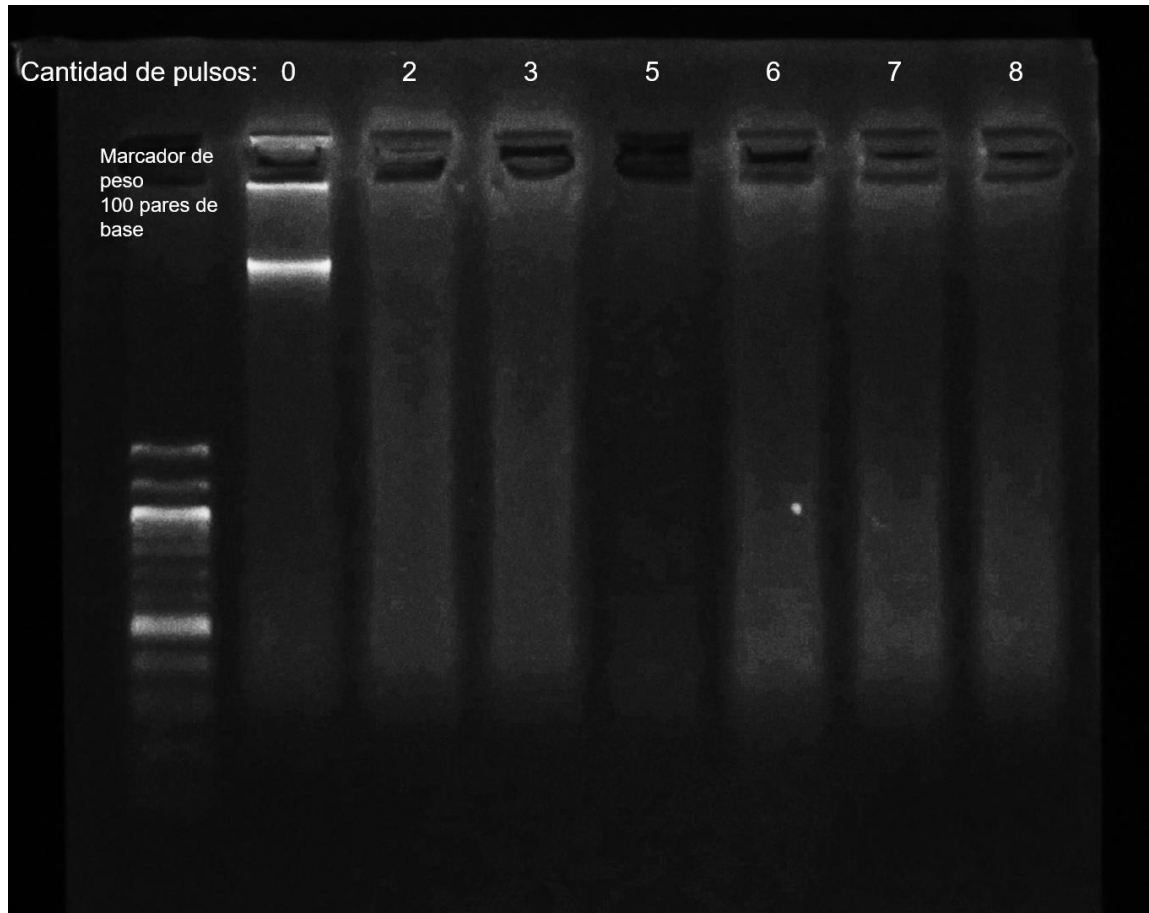


Figura 3.3. Gel de agarosa al 1% teñido con gel red mostrando los resultados de distintas cantidades de pulsos de sonicación hechos a una muestra de ADN de cereza (Lapins), para observar el tamaño de corte resultante. El marcador de peso molecular corresponde a 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.

3.4 Análisis qPCR ADN metilado

Los resultados de la PCR en tiempo real arrojan una clara diferencia entre las muestras que pasaron por el tratamiento de MeDip al compararlas con sus contrapartes que no pasaron por un tratamiento (Fig. 3.4). Las curvas negras, correspondientes al ADN metilado, presentan un umbral de amplificación más tardío que las curvas rojas (ADN no tratado). Esta diferencia corresponde a un

retraso en la captación de la señal de fluorescencia mínima detectable, para el ADN metilado de las cuatro muestras se llega a este umbral después del ciclo 30, mientras que en las muestras con ADN intacto la señal es captada en su mayoría antes del ciclo 28.

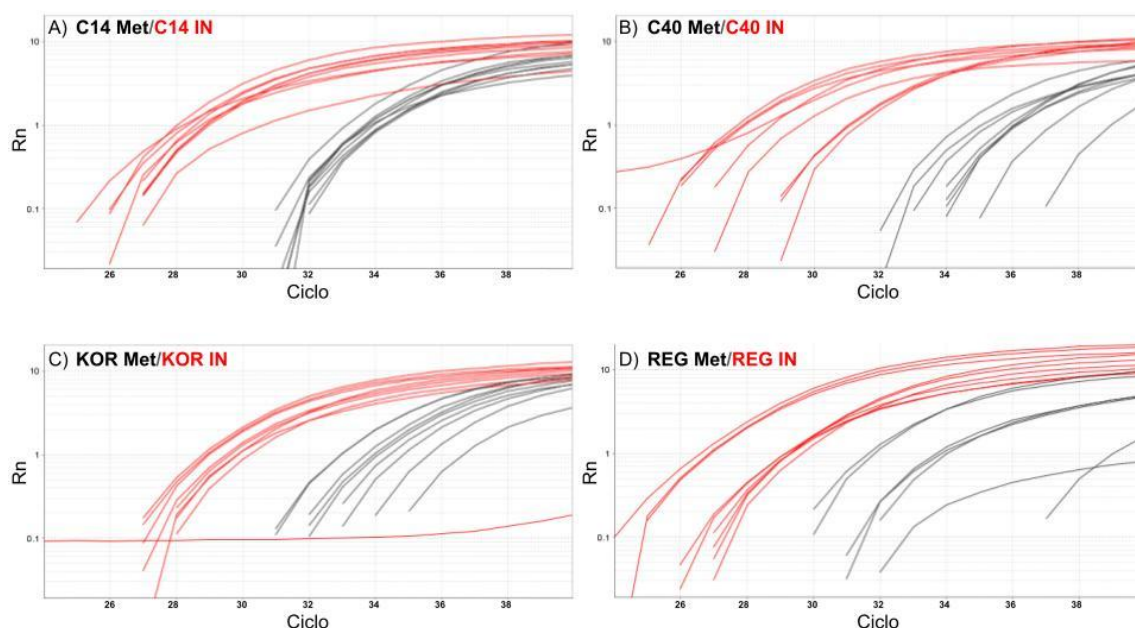


Figura 3.4. Curvas de amplificación obtenidas mediante qPCR utilizando EvaGreen como colorante, comparando ADN metilado inmunoprecipitado (curvas negras) y ADN no tratado (curvas rojas) en cuatro variedades de cereza. Cada subfigura representa una variedad específica: (A) Royal Dawn (C14), (B) Royal Lee (C40), (C) Kordia (KOR), y (D) Regina (REG). En cada subfigura se incluyen tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas, para un total de nueve curvas por condición (tratado y no tratado). El eje X muestra el número de ciclos de amplificación, mientras que el eje Y representa el valor reportero normalizado (Rn).

Los datos obtenidos, presentados en un gráfico tipo boxplot (Figura 3.5), evidencian un incremento en el porcentaje de metilación en una de las

variedades tardías (Kordia), mientras que las variedades tempranas (C14 - Royal Dawn y C40 - Royal Lee) muestran niveles de metilación consistentemente bajos. Entre las variedades tardías, Kordia destaca no solo por un mayor porcentaje de metilación promedio, sino también por una mayor dispersión en los valores, en contraste con Regina, que presentó niveles más bajos y menos variables.

La variación observada en las curvas de amplificación entre las muestras sugiere que factores técnicos o diferencias experimentales podrían estar influyendo en los resultados, destacando la importancia de un control riguroso de las condiciones experimentales para asegurar la reproducibilidad de los datos.

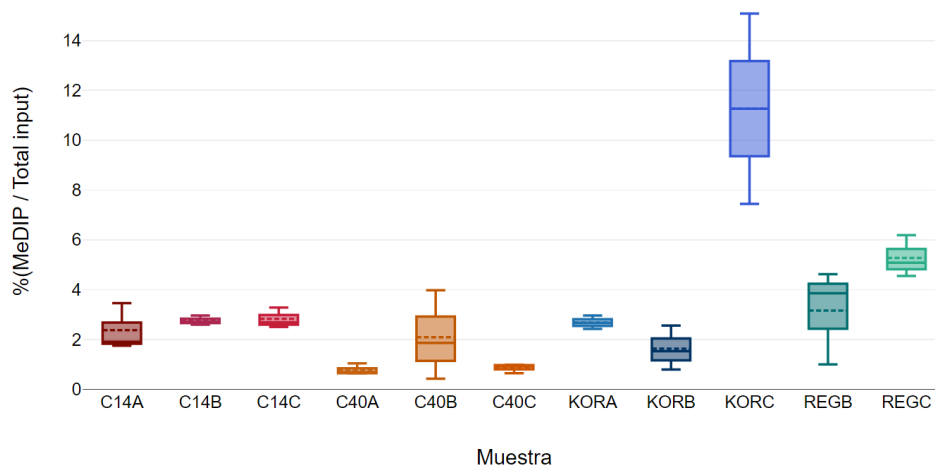


Figura 3.5. Gráfico boxplot que compara el porcentaje de ADN metilado con relación al ADN total. Las variedades C14 (Royal Dawn), C40 (Royal Lee), KOR (Kordia) y REG (Regina) incluyen tres réplicas biológicas (A, B y C), excepto Regina, que tiene solo dos réplicas (REGB y REGC), además de tres réplicas técnicas por réplica biológica (N=3).

IV. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue identificar una relación de utilidad práctica entre los niveles de metilación de las citosinas y un rasgo fenológico específico en diferentes variedades de *P. avium*. Además, se planteó como un primer acercamiento hacia el diseño de un proceso que podría llegar a ayudar en la creación de herramientas aplicables al reconocimiento y diferenciación de variedades de uso comercial. Evaluar la efectividad del enfoque tomado y determinar los aspectos a mejorar para optimizar el proceso resultó uno de los rasgos más relevantes del estudio.

Los resultados obtenidos podrían dar la posibilidad de distinguir las variedades estudiadas, según su fecha de recolección. El análisis *in silico* mostró diferencias significativas a nivel del metiloma, lo cual, junto con la evidencia bibliográfica sobre la correlación entre variabilidad epigenética y fenológica (Avramidou et al., 2021), sugiere que las diferencias epigenéticas podrían estar vinculadas con variaciones en rasgos fenológicos.

El establecer una conexión directa entre los epialelos identificados en este estudio y los rasgos fenológicos relacionados con la fecha de cosecha es un desafío que requiere considerar tanto los avances metodológicos como las limitaciones específicas de esta investigación. Por ejemplo, aunque se han reportado enfoques como el mapeo de epiQTL (Epigenetic Quantitative Trait

Locus) en especies como *Populus spp.*, donde se identificaron epiQTL relacionados con procesos como la lignificación y propiedades de la madera (Lu et al., 2020), en nuestro caso, no fue posible generar suficiente resolución para identificar y asociar regiones genómicas específicas y con la fecha de cosecha. Este hecho sugiere que sería conveniente poder agregar información a nuestra base datos epigenómica, incluyendo datos del metiloma de variedades en diferentes etapas de crecimiento y desarrollo para poder facilitar el estudio de las zonas epialelicas estables a través del tiempo y su relación a la divergencia fenológica.

Asimismo, estudios como los realizados en *Quercus lobata* (Gugger et al., 2016), que vinculan patrones de metilación con respuestas a gradientes climáticos, destacan la importancia de factores ambientales en la regulación epigenética. En este sentido, nuestros resultados no evalúan la estabilidad de los patrones de metilación observados, por lo que podría sugerirse que el entorno podría estar modulando los patrones de metilación observados, particularmente en las variedades tardías. Esto refuerza la necesidad de incorporar análisis ambientales longitudinales en futuras investigaciones para validar la estabilidad de estos patrones en diferentes condiciones de cultivo.

Por otro lado, los enfoques basados en líneas recombinantes epigenéticas (epiRILs), como los empleados en *Arabidopsis thaliana* para estudiar la influencia de epialelos en la floración (Cortijo et al., 2014), podrían ser útiles para confirmar si los epialelos detectados en nuestro trabajo tienen efectos

causales sobre la fenología del cerezo. Sin embargo, la implementación de estas metodologías en especies perennes como el cerezo implica desafíos significativos, particularmente en términos de tiempo y recursos experimentales.

Además, los avances en la predicción de rasgos fenológicos basados en datos epigenéticos, como los demostrados en *A. thaliana* (Hu et al., 2015), *S. lycopersicum* (Manning et al., 2006) y *Elaeis guineensis* (Ong-Abdullah et al., 2015), demuestran el potencial de técnicas como MeDIP-Chip o la secuenciación por bisulfito para identificar marcadores epigenéticos. Aunque nuestros datos preliminares no permitieron una validación concluyente de los epialelos como marcadores epigenéticos, si representan la posibilidad de que una combinación de técnicas avanzadas, como qPCR y secuenciación, pueda ser utilizada en futuros trabajos para superar estas limitaciones.

El desarrollo de epi-marcadores específicos para especies comerciales es una futura herramienta fundamental, ya que nos permitiría adaptar herramientas, ya sea existente o por desarrollar, dándoles un enfoque epigenético y así poder abarcar diversos sistemas biológicos. Esto llevaría directamente a la optimización de la predicción de rasgos complejos, impactando directamente en la mejora del rendimiento, la sostenibilidad y la selección de líneas de alto valor comercial en cultivos agrícolas.

Entre los resultados se puede destacar la información obtenida acerca de los genes que fueron reconocidos como sitios de interés por su divergencia en estados de metilación dependiente de la variedad. Los genes analizados presentan características que pueden estar relacionadas al proceso fenológico estudiado, destacándose que cuatro de ellos tienen una posible implicación en la regulación del desarrollo y la maduración de frutos. Entre ellos, polygalacturonase-like y GDSL esterase/lipase At5g22810 están relacionados con la remodelación de la pared celular, un proceso crítico para el ablandamiento y la textura del fruto durante su maduración (Qiu et al., 2024). En particular, se ha demostrado que las GDSL esterases/lipasas están implicadas en diferentes etapas durante el desarrollo de los frutos de *Pyrus bretschneideri* (Cao et al., 2018).

Por otro lado, la probable protein phosphatase 2C 55 destaca por su posible participación en la señalización mediada por ácido abscísico (ABA), una hormona clave en la regulación de la dormancia, la maduración y la respuesta al estrés abiótico en plantas. Investigaciones han señalado que miembros de esta familia, particularmente de la subfamilia D, actúan como reguladores positivos en vías de ABA, lo que refuerza su potencial conexión con eventos fenológicos como la sincronización del desarrollo del fruto (Takei et al., 2001).

Finalmente, RINT1-like protein MAG2L podría influir indirectamente en el desarrollo del fruto mediante su participación en el transporte retrógrado de proteínas entre el Golgi y el retículo endoplásmico. Este proceso es esencial

para el ensamblaje y tráfico de proteínas involucradas en el metabolismo y la respuesta al estrés (Xue et al., 2008). Estos genes podrían ser claves en procesos como posibles puntos de control, lo que resalta su posible importancia en la regulación del desarrollo y maduración del fruto en *P. avium*.

Desde una perspectiva práctica, los hallazgos de este estudio podrían facilitar la selección de variedades de *P. avium* con tiempos de cosecha óptimos para mercados específicos. La idea de desarrollar herramientas epigenéticas que permitan diferenciar cultivares tempranos y tardíos a partir de plantas jóvenes tiene un gran potencial para optimizar los procesos de selección de rasgos y mejorar la coordinación en la recolección y exportación de frutos. Además, este enfoque podría integrarse en estrategias de mejoramiento genético, utilizando epialelos y epimutaciones como componentes clave para la generación de nuevos cultivares.

No obstante, el estudio enfrentó limitaciones técnicas significativas que afectaron la estabilidad de los resultados. El diseño de primers fue particularmente desafiante, ya que se requirió alinear partidores con regiones sin SNP entre variedades para que estos funcionaran de manera transversal, garantizar un amplicón de 100-200 pb y equilibrar el contenido GC y la TM entre los partidores. Además, el ADN extraído de los frutos presentó altas concentraciones de azúcares, lo que afectó al momento de precipitar el contenido, lo que resultó en una sustancia viscosa que posiblemente redujo la

concentración de ADN utilizable. La limitada cantidad de ADN tratado tras la inmunoprecipitación también restringió el número de réplicas experimentales.

Futuras investigaciones podrían centrarse en metodologías como E-WAS y EpiQTL para identificar regiones específicas del genoma relacionadas directamente con la variabilidad fenológica (Gahlaut et al, 2020). Estas aproximaciones permitirían no solo explorar el epigenoma de manera amplia, sino también vincular directamente los epialelos con loci genéticos y rasgos cuantitativos, proporcionando un marco más robusto para desarrollar epimarcadores aplicables en programas de mejoramiento agrícola y manejo de cultivos de *P. avium*.

V. CONCLUSIONES

Los presentes resultados corroboran parcialmente la hipótesis alternativa de este trabajo. Se identificaron patrones de hipo e hipermetilación en genes clave asociados a procesos como la remodelación de la pared celular y la señalización hormonal, los cuales podrían estar relacionados con el desarrollo y la maduración de los frutos. Estos hallazgos respaldan el uso potencial de epimarcadores para diferenciar variedades de cosecha temprana y tardía, contribuyendo al desarrollo de herramientas prácticas para la selección de cultivares en etapas tempranas de desarrollo.

Desde una perspectiva práctica, este enfoque puede facilitar la optimización de la planificación agrícola y la exportación de frutos, fortaleciendo la sostenibilidad de la producción. Sin embargo, se destaca la necesidad de optimizar metodologías experimentales para garantizar mayor precisión en las cuantificaciones y replicabilidad de los resultados.

VI. GLOSARIO

-ABA (Ácido Abscísico): Hormona vegetal que regula procesos como la germinación, el cierre estomático y la respuesta al estrés hídrico.

-ADNc (Ácido desoxirribonucleico copia): ADN obtenido después del proceso de replicación. Es solo la parte codificante del genoma, sin intrones.

-ADNg (Ácido desoxirribonucleico genómico): ADN completo, contiene la parte codificante (exones), no codificante (intrones) y promotores.

-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Técnica que se utiliza para detectar polimorfismos en el ADN y generar marcadores moleculares

-BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie): Escala de origen alemán para codificar las etapas fenológicas del desarrollo de las plantas.

-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos.

-bp (Base pairs): Pares de bases que forman el ADN o ARN.

-Ct (Cycle Threshold): Ciclo umbral donde la curva de PCR cruza el umbral en la parte lineal de la curva.

-DMRs (Differentially Methylated Regions): Regiones diferencialmente metiladas.

-Epialelos: Alelos que difieren en patrones de metilación en lugar de en los nucleótidos de la secuencia de ADN.

-Epigenoma: Conjunto completo de modificaciones epigenéticas en el genoma de un organismo.

-Epi-marcadores: Marcadores epigenéticos que permiten identificar cambios en la expresión génica.

-Epimutante: Organismo o célula con alteraciones en el epigenoma, que genera un fenotipo divergente.

-epiQTL (Epigenetic Quantitative Trait Loci): Loci de caracteres cuantitativos asociados a variación epigenética. Son locus que se correlacionan con la variación de un rasgo cuantitativo en el fenotipo de una población de organismos.

-epiRILs (Epigenetic Recombinant Inbred Lines): Líneas endogámicas recombinantes epigenéticas. Son poblaciones de plantas que se crean cruzando plantas con diferentes perfiles de metilación del ADN. Se utilizan para estudiar el papel de los cambios epigenéticos en las plantas

-EWAS (Epigenome-Wide Association Studies): Estudios de asociación del epigenoma. El objetivo de los EWAS es identificar variaciones epigenéticas que estén estadísticamente asociadas a un fenotipo de interés.

-Islas CpG: Regiones ricas en dinucleótidos citosina y guanidina, donde generalmente ocurre metilación del ADN.

-LeSPL-CNR (*Lycopersicon esculentum* SQUAMOSA Promoter-Binding-Like, Colorless Non-Ripening): Factor de transcripción relacionado con la maduración de frutos en tomate.

-MeDIP (Methylated DNA Immunoprecipitation): Inmunoprecipitación de ADN metilado, es una técnica que es capaz de detectar y aislar fragmentos de ADN metilado de una muestra utilizando anticuerpos sensibles a la metilación.

-MeDIP-Chip (Methylated DNA Immunoprecipitation Microarray): Microarreglos basados en inmunoprecipitación de ADN metilado, permite detectar la metilación del ADN en todo el genoma o en islas CpG.

-Metilación: Modificación química del ADN que puede regular la expresión génica.

-Metiloma: Perfil completo de metilación de un genoma.

-MSPA (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism): Polimorfismo amplificado sensible a la metilación. Técnica que combina PCR y digestión

enzimática para detectar polimorfismos en regiones de ADN influenciadas por la metilación.

-MYB: Familia de factores de transcripción que se unen al ADN para regular procesos como el desarrollo, la diferenciación y las respuestas a estrés en plantas y animales.

-NCBI (National Center for Biotechnology Information): Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

-Oligos: Oligonucleótidos: cadenas cortas de ADN o ARN sintetizadas químicamente.

-PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa, técnica para amplificar ADN.

Polimorfismo: Variación en la secuencia de ADN entre individuos.

-PromethION: Plataforma de secuenciación de alto rendimiento de Oxford Nanopore.

-qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction): PCR cuantitativa para medir ADN o ARN.

-RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): PCR con transcriptasa inversa para convertir ARN en ADNc antes de amplificar.

-SBP-box (SQUAMOSA Promoter Binding Protein Box): Familia de factores de transcripción relacionados con el desarrollo vegetal.

-SCORE: Puntaje numérico que indica la calidad del alineamiento entre secuencias en BLAST.

-SNP (Single Nucleotide Polymorphism): Polimorfismo de nucleótido único, variación en una sola base del ADN.

-Taq: Enzima Taq polimerasa utilizada en PCR proveniente de *Thermus aquaticus*.

-TM (Melting Temperature): Temperatura de fusión del ADN, donde las hebras se separan.

-WD40: Superfamilia de proteínas que participan en procesos como la regulación transcripcional, el ensamblaje de complejos proteicos y las vías de señalización celular.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, G., Kudapa, H., Ramalingam, A., Choudhary, D., Sinha, P., Garg, V., Singh, V. K., Patil, G. B., Pandey, M. K., Nguyen, H. T., Guo, B., Sunkar, R., Niederhuth, C. E., & Varshney, R. K. (2020). Epigenetics and epigenomics: underlying mechanisms, relevance, and implications in crop improvement. *Funct Integr Genomics*, 20(6), 739-761. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00756-7>
- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., & Burgos, L. (2008). Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany*, 64(2), 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.01.003>
- Avramidou, E. V., Moysiadis, T., Ganopoulos, I., Michailidis, M., Kissoudis, C., Valasiadis, D., Kazantzis, K., Tsaroucha, E., Tsaftaris, A., Molassiotis, A., Aravanopoulos, F. A., & Xanthopoulou, A. (2021). Phenotypic, Genetic, and Epigenetic Variation among Diverse Sweet Cherry Gene Pools. *Agronomy*, 11(4), 680. <https://www.mdpi.com/2073-4395/11/4/680>
- Ball, P. (2013). DNA: Celebrate the unknowns. *Nature*, 496(7446), 419-420. <https://doi.org/10.1038/496419a>
- Bapat, V. A., Trivedi, P. K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R., & Nath, P. (2010). Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Adv*, 28(1), 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.10.002>
- Bretó, M. P., Ruiz, C., Pina, J. A., & Asíns, M. J. (2001). The diversification of Citrus clementina Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol Phylogenet Evol*, 21(2), 285-293. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1008>

- Cao, Y., Han, Y., Meng, D., Abdullah, M., Yu, J., Li, D., Jin, Q., Lin, Y., & Cai, Y. (2018). Expansion and evolutionary patterns of GDSL-type esterases/lipases in Rosaceae genomes. *Funct Integr Genomics*, 18(6), 673-684. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0620-1>
- Cortijo, S., Wardenaar, R., Colomé-Tatché, M., Gilly, A., Etcheverry, M., Labadie, K., Caillieux, E., Hospital, F., Aury, J. M., Wincker, P., Roudier, F., Jansen, R. C., Colot, V., & Johannes, F. (2014). Mapping the epigenetic basis of complex traits. *Science*, 343(6175), 1145-1148. <https://doi.org/10.1126/science.1248127>
- Ellena, D., Miguel (Ed.). (2006). Cultivo del cerezo para la zona sur de Chile. Boletín INIA, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (No. 135). <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7092>
- Gahlaut, V., Zinta, G., Jaiswal, V., & Kumar, S. (2020). Quantitative Epigenetics: A New Avenue for Crop Improvement. *Epigenomes*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/epigenomes4040025>
- Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-Fournier, N., Richard-Molard, C., Vile, D., & Brunel-Muguet, S. (2017). Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends Plant Sci*, 22(7), 610-623. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.009>
- Gugger, P. F., Fitz-Gibbon, S., PellEgrini, M., & Sork, V. L. (2016). Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Mol Ecol*, 25(8), 1665-1680. <https://doi.org/10.1111/mec.13563>
- Hu, Y., Morota, G., Rosa, G. J. M., & Gianola, D. (2015). Prediction of Plant Height in *Arabidopsis thaliana* Using DNA Methylation Data. *Genetics*, 201(2), 779-793. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177204>
- Jahed, K. R., & Hirst, P. M. (2023). Fruit growth and development in apple: a molecular, genomics and epigenetics perspective. *Front Plant Sci*, 14, 1122397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1122397>

- Ji, Y., & Wang, A. (2023). Recent advances in epigenetic triggering of climacteric fruit ripening. *Plant Physiol*, 192(3), 1711-1717. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad206>
- Kuhn, N., Ponce, C., Arellano, M., Time, A., Multari, S., Martens, S., Carrera, E., Sagredo, B., Donoso, J. M., & Meisel, L. A. (2021). ABA influences color initiation timing in *P. avium* L. fruits by sequentially modulating the transcript levels of ABA and anthocyanin-related genes. *Tree Genetics & Genomes*, 17(2). <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01502-1>
- Kuhn, N., Maldonado, J., Ponce, C., Arellano, M., Time, A., Multari, S., Martens, S., Carrera, E., Donoso, J. M., Sagredo, B., & Meisel, L. A. (2021). RNAseq reveals different transcriptomic responses to GA(3) in early and midseason varieties before ripening initiation in sweet cherry fruits. *Sci Rep*, 11(1), 13075. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92080-8>
- Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *J Exp Bot*, 65(16), 4561-4575. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru277>
- Licciardello, C., Perrone, I., Gambino, G., Velasco, R., & Talon, M. (2023). Editorial: Functional genomics in fruit trees: from 'omics to sustainable biotechnologies, volume II. *Front Plant Sci*, 14, 1188832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1188832>
- Liu, G., Fu, D., Duan, X., Zhou, J., Chang, H., Xu, R., Wang, B., & Wang, Y. (2024). Integrated Metabolome, Transcriptome and Long Non-Coding RNA Analysis Reveals Potential Molecular Mechanisms of Sweet Cherry Fruit Ripening. *Int J Mol Sci*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/ijms25189860>
- Lu, W., Xiao, L., Quan, M., Wang, Q., El-Kassaby, Y. A., Du, Q., & Zhang, D. (2020). Linkage-linkage disequilibrium dissection of the epigenetic quantitative trait loci (epiQTLs) underlying growth and wood properties in *Populus*. *New Phytologist*, 225(3), 1218-1233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.16220>

- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J., & Seymour, G. B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet*, 38(8), 948-952. <https://doi.org/10.1038/ng1841>
- Ming, Y., Jiang, L., & Ji, D. (2023). Epigenetic regulation in tomato fruit ripening. *Front Plant Sci*, 14, 1269090. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1269090>
- Narváez, G., Muñoz-Espinoza, C., Soto, E., Rothkegel, K., Bastías, M., Gutiérrez, J., Bravo, S., Hasbún, R., Meneses, C., & Almeida, A. M. (2022). Global Methylation Analysis Using MSAP Reveals Differences in Chilling-Associated DNA Methylation Changes during Dormancy Release in Contrasting Sweet Cherry Varieties. *Horticulturae*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100962>
- Ong-Abdullah, M., Ordway, J. M., Jiang, N., Ooi, S. E., Kok, S. Y., Sarpan, N., Azimi, N., Hashim, A. T., Ishak, Z., Rosli, S. K., Malike, F. A., Bakar, N. A. A., Marjuni, M., Abdullah, N., Yaakub, Z., Amiruddin, M. D., Nookiah, R., Singh, R., Low, E. T. L.,...Martienssen, R. A. (2015). Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm [Article]. *Nature*, 525(7570), 533-537. <https://doi.org/10.1038/nature15365>
- Pinosio, S., Marroni, F., Zuccolo, A., Vitulo, N., Mariette, S., Sonnante, G., Aravanopoulos, F. A., Ganopoulos, I., Palasciano, M., Vidotto, M., Magris, G., Iezzoni, A., Vendramin, G. G., & Morgante, M. (2020). A draft genome of sweet cherry (*Prunus avium* L.) reveals genome-wide and local effects of domestication. *Plant J*, 103(4), 1420-1432. <https://doi.org/10.1111/tpj.14809>
- Prudencio, A. S., Werner, O., Martinez-Garcia, P. J., Dicenta, F., Ros, R. M., & Martinez-Gomez, P. (2018). DNA Methylation Analysis of Dormancy Release in Almond (*Prunus dulcis*) Flower Buds Using Epi-Genotyping by Sequencing. *Int J Mol Sci*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113542>

- Qiu, Z., Hou, Q., Wen, Z., Tian, T., Hong, Y., Yang, K., Qiao, G., & Wen, X. (2024). Identification of PavHB16 gene in *Prunus avium* and validation of its function in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Biol Plants*, 30(4), 559-570. <https://doi.org/10.1007/s12298-024-01443-8>
- Reyes, A. (2022). Cereza: temporada 2021/2022 en la República Popular China y diversificación de mercados. *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura*. Recuperado de www.odepa.gob.cl
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Wenger, A. M., Zehir, A., & Mesirov, J. P. (2017). Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res*, 77(21), e31-e34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0337>
- Róis, A. S., Rodríguez López, C. M., Cortinhas, A., Erben, M., Espírito-Santo, D., Wilkinson, M. J., & Caperta, A. D. (2013). Epigenetic rather than genetic factors may explain phenotypic divergence between coastal populations of diploid and tetraploid *Limonium* spp. (Plumbaginaceae) in Portugal. *BMC Plant Biol*, 13, 205.
- Rothkegel, K., Sanchez, E., Montes, C., Greve, M., Tapia, S., Bravo, S., Prieto, H., & Almeida, A. M. (2017). DNA methylation and small interference RNAs participate in the regulation of MADS-box genes involved in dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Physiol*, 37(12), 1739-1751. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx055>
- Savadi, S., Mangalassery, S., & Sandesh, M. S. (2021). Advances in genomics and genome editing for breeding next generation of fruit and nut crops. *Genomics*, 113(6), 3718-3734. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.09.001>
- Schmitz, R. J., Schultz, M. D., Urich, M. A., Nery, J. R., Pelizzola, M., Libiger, O., Alix, A., McCosh, R. B., Chen, H., Schork, N. J., & Ecker, J. R. (2013). Patterns of population epigenomic diversity. *Nature*, 495(7440), 193-198. <https://doi.org/10.1038/nature11968>
- Shirasawa, K., Isuzugawa, K., Ikenaga, M., Saito, Y., Yamamoto, T., Hirakawa, H., & Isobe, S. (2017). The genome sequence of sweet cherry (*Prunus*

- avium) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Res*, 24(5), 499-508. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx020>
- Springer, N. M., & Schmitz, R. J. (2017). Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. *Nat Rev Genet*, 18(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.45>
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28(6), 1102, 1104. <https://doi.org/10.2144/00286ir01>
- Takei, K., Sakakibara, H., & Sugiyama, T. (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276(28), 26405-26410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102130200>
- Tang, D., Gallusci, P., & Lang, Z. (2020). Fruit development and epigenetic modifications. *New Phytol*, 228(3), 839-844. <https://doi.org/10.1111/nph.16724>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehlting, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C., & Zhong, Y. (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, 9, 550. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-550>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.

VIII. APÉNDICE

Utilizando el software IGV (Integrative genome viewer) se pueden distinguir las características de interés presentes en las DMR elegidas (Figura A.1).

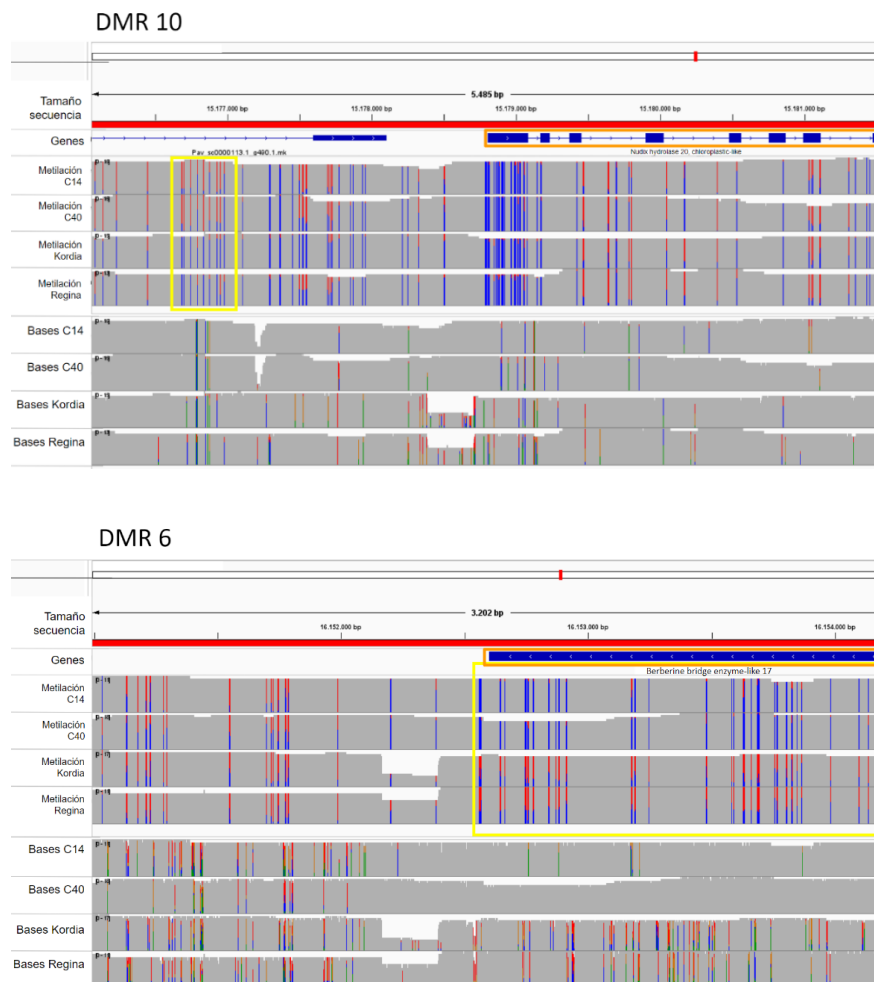


Figura A.1. Vista de dos DMRs (DMR 6 y DMR 10) desde IGV. En amarillo se destaca la metilación diferencial entre las variedades tempranas (C14 y C40) y

las variedades tardías (Kordia y Regina). En naranja se destaca el gen candidato correspondiente a la DMR.

Tabla A2. Lista de partidores diseñados para cada DMR, se incluye la secuencia, la Tm (C°), porcentaje GC y el nombre del gen correspondiente.

Nombre Partidor	Secuencia 5'-3'	Tm	GC%	Gen
P.AVIUM_F_dmr1	AGGTTTAGCACGTGAAGATGC	58,9	48	protein TAB2 homolog, chloroplastic-
P.AVIUM_R_dmr1	AGAGGAAATCTCATCCTTGGA	58,3	43	like
P.AVIUM_F_dmr2	TGACACAGTTGTCGCTAAGG	59,1	50	polygalacturonase-like
P.AVIUM_R_dmr2	GCATTACCGTTCAAGAAAC	53,7	40	
P.AVIUM_F_dmr3.2	TCCCTGAAGTCAAAGTATGGG	59,9	48	probable protein phosphatase 2C 55
P.AVIUM_R_dmr3.2	CGCCGGAAAACATCATAGAAG	60,9	52	
P.AVIUM_F_dmr3.1	TACTTGTTATACGGCCCTCCT	59,5	48	
P.AVIUM_R_dmr3.1	CCAACATCTGCTAGTTGTCAT	56,1	43	
P.AVIUM_F_dmr4	ACTCTCAAGACACCTAACCC	59,1	50	receptor-like protein 2
P.AVIUM_R_dmr4	CACCACGAGTACTTCTTCCG	60,5	55	
P.AVIUM_F_dmr5	CTTCACCAGCCGTTTCAGTA	59,5	50	tRNA dimethylallyltransferase 9
P.AVIUM_R_dmr5	CCCTTTCCAGGAGTTTGAT	61	50	
P.AVIUM_F_dmr6	ATTCATTGGCCATTTCTTGGG	58,5	43	berberine bridge enzyme-like 17
P.AVIUM_R_dmr6	GCTGAGAAGAATTTCTATGGG	55,1	43	
P.AVIUM_F_dmr7	TCCTCTGCCGTGTTTATTCC	59,8	50	hypersensitive-induced response
P.AVIUM_R_dmr7	GAGAACCCTGAAGAAGTCCA	60,1	50	protein 1
P.AVIUM_F_dmr8	AAGCTGCTCTTGAGGCTTTT	58,2	45	RINT1-like protein MAG2L
P.AVIUM_R_dmr8	ATGGGTGGAAGACCAGTTGC	63,3	55	
P.AVIUM_F_dmr9	GTTAGGTACAAGTTCATGGG	55,1	45	GDGL esterase/lipase At5g22810
P.AVIUM_R_dmr9	CAGTCAAACCAAGCCCAATG	59,6	50	
P.AVIUM_F_dmr10	GTCCAACAGGCCATCATGTA	59,6	50	nudix hydrolase 20, chloroplastic-like
P.AVIUM_R_dmr10	CTTGTCGTAGAACTCCAAC	56,7	45	