



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

VALIDACIÓN DE LA VARIANTE GENÓMICA ESTRUCTURAL SNP PARA
DISCRIMINAR VARIEDADES DE CEREZO CON DISTINTOS NIVELES DE
PRECOCIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS.

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

POR: Javiera Péndola Marambio

Profesores Guía: Rodrigo Hasbún Zaror

Herman Silva Ascencio

Agosto, 2025

Concepción, Chile

© 2025, Javiera Péndola Marambio

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

VALIDACIÓN DE LA VARIANTE GENÓMICA ESTRUCTURAL SNP PARA
DISCRIMINAR VARIEDADES DE CEREZO CON DISTINTOS NIVELES DE
PRECOCIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS.

Profesor Guía



Rodrigo Hasbún Zaror

Profesor Asociado

Ingeniero Forestal, PhD.

Profesor Guía

Herman Patricio
Silva Ascencio
8.541.928-5
16/08/2025 - 23:16
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
CV: 81ry3yimfw6zaddkcbb3mn4qc



UNIVERSIDAD
DE CHILE

Herman Silva Ascencio

Colaborador Externo

Bioquímico, PhD.

DEDICATORIA

Dedicada a mis padres Carolina Marambio y Edinson Péndola, por ser mi sostén inquebrantable en cada etapa de mi vida, por creer en mí incluso antes que yo misma, y por ser el combustible que me impulsa hacia adelante. Mi más grande motivación siempre será el hacerlos sentir orgullosos, que sepan que el trabajo que hicieron y el amor que me dieron rindió frutos. Hoy estoy aquí gracias a ustedes, por lo que este logro es tan mío como suyo, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible este camino. A mis profesores tutores, Rodrigo Hasbún y Herman Silva, y a mis antiguos profesores, Narciso Aguilera y Lubia Guedes, por su guía, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, por enseñarme a amar mi carrera con pasión y a formarme como una buena profesional. A las lindas amistades que conocí en la universidad, las que llenaron los espacios vacíos en mi corazón con risas, apoyo y complicidad, que hicieron más llevaderos los días difíciles y más memorables los días felices. Cada conversación, cada salida y cada momento compartido se quedará conmigo por siempre.

A mi familia, que aun cuando la distancia nos separaba, estuvo presente en cada logro y en cada caída. A mis padres, mi pilar fundamental, no podría haber elegido mejores padres; y a mis abuelas, Mami Techí y Poli, por su amor eterno y ricas comidas. Ustedes me han dado todo y más, y espero que llegue el día en que pueda retribuirles, aunque sea una parte de su esfuerzo y cariño, aunque ninguna fortuna en el mundo se compara con lo que me han brindado: enseñanzas, consejos, experiencias, amor e incluso amistad; todo lo encuentro en ustedes. Estaré por siempre agradecida de ser su hija y nieta.

A mi compañero de vida, Diego Pereira, a quien conocí al inicio de esta carrera y con quien he compartido seis años llenos de amor, crecimiento, desafíos y alegrías. Gracias por tu compañía y apoyo constante, que me han dado la fuerza para llegar hasta aquí. Hemos recorrido mucho juntos, pero sé que esto es solo el comienzo, aún nos espera un sinfín de experiencias por descubrir y metas por alcanzar lado a lado.

Y, por último, a mi gata Maiden, que estuvo acostada en mis piernas, dándome calor y ronroneos durante todo el proceso de escritura de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. METODOLOGÍA.....	9
III. RESULTADOS.....	17
IV. DISCUSIÓN.....	53
V. CONCLUSIÓN.....	65
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Detalle de cada uno de los partidores diseñados.	25
Tabla 3.2. Resultado de la validación de Tm y tamaño del amplicón de cada par de partidores.	27
Tabla 3.3. Conjuntos definitivos de partidores para los análisis posteriores.	31
Tabla 3.4. Tm obtenidas por qPCR-HRM a partir de los ADN "A" y "B" para las variedades Royal Lee (R.L) y Regina (REG) en función del método de extracción y dilución (1:1; 1:10 y 1:100).	36
Tabla 3.5. Tm obtenidas a partir del HRM para el conjunto de partidores TP2-TP1 para las cuatro variedades analizadas, utilizando ADN "A".	38
Tabla 3.6. Tm obtenidas a partir del HRM para el conjunto de partidores TD2-TD1 para las cuatro variedades analizadas, utilizando ADN "A".	41
Tabla 3.7. Tm obtenidas a partir del HRM del conjunto de partidores TP2-TP1 para las diez variedades analizadas, utilizando ADN "C".	49
Tabla 3.8. Tm obtenidas a partir del HRM del conjunto de partidores TD2-TD1 para las diez variedades analizadas, utilizando ADN "C".	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 3. 1 Evaluación de la integridad de ADN genómico “A” de las variedades Royal Dawn, Royal Lee, Regina y Kordia.	18
Figura 3. 2 Evaluación de la integridad de ADN genómico “B” de las variedades Royal Dawn, Royal Lee, Regina y Kordia.	19
Figura 3. 3 Ventana de IGV de las regiones identificadas.	21
Figura 3. 4 Red de proteínas extraída de STRING.	23
Figura 3. 5 Ruta de la biosíntesis de Zeatina.	24
Figura 3. 6 Amplificación PCR de los conjuntos de partidores TP2 y TD1.	30
Figura 3. 7 Resultado PCR de los conjuntos de partidores.	33
Figura 3. 8 Perfiles de HRM de ADN “A” y “B” de las variedades Royal Lee y Regina obtenidos mediante qPCR.	35
Figura 3. 9 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN “A” para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TP2-TP1.	38
Figura 3. 10 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN “A” para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TD2-TD1.	41
Figura 3. 11 ADN genómico “C” de las seis variedades nuevas.	44
Figura 3. 12 Amplificación mediante PCR convencional a partir de ADN “C” con los conjuntos de partidores TP2-TP1 y TD2-TD1 en variedades de cerezo no incluidas en el análisis in silico.	46
Figura 3. 13 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN “C” para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TP2-TP1.	49
Figura 3. 14 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN “C” para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TD2-TD1.	51

RESUMEN

La diferenciación entre variedades frutales según características fenológicas, como la precocidad en la producción de frutos, es clave para el mejoramiento genético y la eficiencia productiva. En especies como el cerezo dulce (*Prunus avium*), permite optimizar la planificación de cosechas y acceder a mercados con ventanas comerciales diferenciadas. Tradicionalmente, la identificación varietal se ha basado en rasgos morfológicos, con limitaciones en etapas tempranas del desarrollo vegetal. Esta investigación tuvo como objetivo validar polimorfismos de nucleótido único (SNPs) como herramienta genómica para discriminar variedades de cerezo con distintos niveles de precocidad. A partir de datos de secuenciación de tercera generación, se identificaron regiones genómicas diferenciales entre variedades tempranas y tardías cultivadas en Chile (Royal Dawn y Royal Lee versus Regina y Kordia, respectivamente). Se seleccionó una región que contenía un gen ortólogo a la isopenteniltransferasa (IPT), enzima clave en la biosíntesis de citoquininas, hormonas relacionadas con el desarrollo y maduración de frutos. Se diseñaron partidores específicos para estos SNPs, optimizados mediante Temperature Switch PCR (TSP) y aplicados con PCR convencional y qPCR con High Resolution Melting (qPCR-HRM). Los análisis diferenciaron variedades mediante patrones de bandas en geles de agarosa y curvas de fusión en qPCR. La aplicación a un grupo ampliado de variedades mostró resultados consistentes con su clasificación por precocidad. No obstante,

se observaron discrepancias en variedades autocompatibles (Sweetheart, Staccato, Cristobalina), lo que sugiere relación entre precocidad y autocompatibilidad. Estos resultados respaldan el uso de SNPs como herramientas de identificación varietal, con aplicaciones relevantes para la industria frutícola y los programas de mejoramiento genético del cerezo.

ABSTRACT

The differentiation of fruit tree varieties based on phenological traits, such as earliness in fruit production, is key for genetic improvement and productive efficiency. In species such as sweet cherry (*Prunus avium*), it enables optimization of harvest planning and access to markets with differentiated commercial windows. Traditionally, varietal identification has relied on morphological traits, which show limitations at early stages of plant development. This study aimed to validate single nucleotide polymorphisms (SNPs) as a genomic tool to discriminate cherry varieties with different levels of earliness. Using third-generation sequencing data, differential genomic regions were identified between early and late varieties cultivated in Chile (Royal Dawn and Royal Lee versus Regina and Kordia, respectively). A region containing a gene orthologous to isopentenyltransferase (IPT), a key enzyme in cytokinin biosynthesis, hormones related to fruit development and ripening, was selected. Specific primers for these SNPs were designed, optimized through Temperature Switch PCR (TSP), and applied using conventional PCR and qPCR with High Resolution Melting (qPCR-HRM). Analyses differentiated varieties through specific band patterns in agarose gels and distinct melting curves in qPCR. Application to an expanded group of varieties showed results consistent with their classification by earliness. However, discrepancies were observed in self-compatible varieties (Sweetheart, Staccato, Cristobalina), suggesting a possible relationship between earliness and self-

compatibility. These results support the use of specific SNPs as varietal identification tools based on earliness, with relevant applications for the fruit industry and cherry breeding programs.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia económica del cerezo.

Prunus avium, comúnmente conocido como cerezo dulce, es una especie de gran relevancia en la industria frutícola tanto de Chile como del mundo. Esto se ha evidenciado con el aumento exponencial en la producción de cereza a nivel mundial durante la última década. Según datos de la FAO, para el año 2022 la superficie cultivada de cerezo superó los 454 mil hectáreas, mientras que su producción alcanzó los 2.7 millones de toneladas aproximadamente. Chile se encuentra en el tercer puesto de los países con mayor producción de cerezas, después de Turquía y Estados Unidos respectivamente, liderando las exportaciones del hemisferio sur con una producción de 434 mil toneladas y una superficie cultivada de 61 mil hectáreas para el año 2022. La cereza chilena se ha convertido en uno de los productos más exitosos en el área de exportación nacional, siendo catalogada en el año 2021 como el principal producto de exportación del país fuera del sector del cobre (Montt *et al.*, 2024).

1.2. Importancia de las distintas variedades en el comercio.

En el mercado de la industria cerecera, las diferentes variedades de cerezo cumplen un rol fundamental a la hora de satisfacer la demanda durante toda la

temporada. En Chile las variedades de cerezo se clasifican en variedades tempranas, de media estación y tardías, diferenciándose por la precocidad en la maduración de sus frutos, las variedades tempranas son aquellas que maduran y se exportan entre los meses de octubre a noviembre, las de media estación desde noviembre a diciembre, mientras que las variedades tardías lo hacen desde diciembre a febrero aproximadamente (Barros *et al.*, 2020; Ellena, 2012). Esta amplia ventana de producción representa una ventaja importante para la industria cerecera chilena, ya que la etapa de cosecha coincide estacionalmente con el año nuevo chino, el cual es una festividad tradicional relevante en China que constituye un momento crucial para las ventas de cerezas en dicho país. Esto se debe a que la cereza es considerada un regalo de lujo en ocasiones especiales por el simbolismo que se le atribuye: su forma redonda representa la perfección y la eternidad, mientras que su color rojo, la prosperidad y fortuna (García *et al.*, 2019). Es por esto que China es el principal país de destino de las exportaciones de cereza chilena, donde la época de ventas muy temprana es aquella con mayor valor por kg de cereza (Quiroz *et al.*, 2023).

Dado lo anterior, las diferentes variedades de cerezo adquieren una relevancia fundamental, dado que determinan el momento de su exportación. En Chile se cultivan y exportan principalmente 10 variedades: Brooks, Royal Dawn, Santina, Rainier, Bing, Lapins, Skeena, Kordia, Sweet-heart y Regina, en orden de cosecha, donde Brooks es una variedad muy temprana, Royal Dawn; Santina y

Rainier son variedades tempranas, Bing; Lapins y Skeena son variedades medias y finalmente Kordia; Sweet-heart y Regina son variedades tardías (Barros *et al.*, 2020; Cerezos – Viveros Copequen, 2021; Masman, 2022). Estas diferencias constituyen una ventaja, ya que cada variedad posee sus propias consideraciones técnico-productivas, económicas y estratégicas, así como su comportamiento en postcosecha y propiedades organolépticas (Barros *et al.*, 2020).

1.3. Desafíos en la identificación de nuevas variedades debido a la falta de métodos predictivos.

En el cerezo existen variedades autocompatibles y autoincompatibles. Las autocompatibles, como Lapins y Sweet-Heart, pueden fecundarse con polen de la misma flor y variedad, pero aquellas autoincompatibles requieren polen de otras variedades que sean genéticamente compatibles y coincidentes en la floración para asegurar una correcta polinización, como es el caso de Kordia y Regina (Ellena, 2012). La necesidad de polinizadores externos conduce a la falta de precisión a la hora de predecir las características de la progenie, lo que dificulta el trabajo de planificación a largo plazo de agricultores y mejoradores.

Tradicionalmente, la identificación de nuevas variedades se ha basado en la observación de caracteres pomológicos y en la descripción de rasgos morfológicos y agronómicos. Sin embargo, este método requiere esperar

aproximadamente cuatro años hasta que ocurra la primera fructificación, para luego realizar complejas mediciones a lo largo de varios años y garantizar la fiabilidad, ya que las condiciones ambientales inducen inestabilidad en el fenotipo, todo esto convierte este proceso en uno meticuloso y prolongado. Además, el gran número de caracteres a analizar puede dificultar el estudio y hacerlo poco eficiente cuando se necesitan resultados a corto plazo. A pesar de estos desafíos, esta metodología sigue siendo fundamental para la identificación y caracterización de variedades (Rodrigues, 2003).

1.4. Marcadores moleculares para la identificación temprana de nuevas variedades.

La necesidad de métodos más eficientes y rápidos ha impulsado la búsqueda de nuevas técnicas, como la utilización de marcadores moleculares que puedan establecer la identidad de cada cultivar y así superar las limitaciones del análisis morfológico tradicional. Los marcadores moleculares son fragmentos específicos de ADN que pueden identificarse y utilizarse como referencia para detectar variaciones genéticas en un genoma determinado. Estos marcadores se encuentran estrechamente asociados con regiones del ADN que contienen características fenotípicas o genotípicas relevantes y son esenciales en la identificación y desarrollo de cultivares con rasgos específicos, ya que no están sujetos a cambios por el ambiente, están presentes en todos los tejidos y su herencia de tipo mendeliana puede ser monitoreada, lo que los convierte en

instrumentos de amplio alcance para la industria agrícola (Azofeifa-Delgado, 2006).

Los marcadores moleculares tienen diversas aplicaciones: como el mejoramiento genético asistido; la conservación genética; el diagnóstico de enfermedades genéticas; los estudios evolutivos; y la identificación varietal; entre otras (Gill-Langarica & Mayek-Pérez, 2008). En el ámbito agrícola, la aplicación varietal es una de las más relevantes, ya que es una técnica clave para identificar genes asociados con características de interés agronómico, lo cual resulta crucial para la selección de nuevas variedades mejoradas, capaces de adaptarse a las condiciones ambientales adversas y abarcando atributos demandados por la industria (Campos *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar del progreso que ha significado el uso de estos marcadores, al momento de generarse nuevas variedades, se presenta la limitación de requerir una caracterización previa para establecer correlaciones entre los marcadores y los rasgos de interés, lo que limita su aplicación directa. Debido a esto, esta tesis busca desarrollar marcadores que superen esta restricción y logren predecir el fenotipo de una nueva variedad en cuanto a la precocidad en la producción de frutos desde la etapa vegetativa temprana de la planta. Esto aceleraría los procesos de mejoramiento genético, la optimización en la selección de variedades y una respuesta más eficiente a las demandas agrícolas contemporáneas (Mondini *et al.*, 2009).

1.5. Polimorfismos de nucleótido único en plantas.

Estudios realizados en otras especies sostienen el potencial de las variantes estructurales para la identificación temprana de rasgos fenotípicos. Las variantes estructurales, que incluyen deleciones; inserciones; duplicaciones; inversiones; translocaciones y polimorfismos, son una fuente importante de variación genética. Estas variaciones desempeñan roles críticos en la evolución de las plantas y en rasgos agronómicos como por ejemplo la forma del fruto en el tomate (*Solanum lycopersicum*); la resistencia a nematodos en la soja (*Glycine max*); el color de la piel en manzana (*Malus domestica*); la reproducción asexual en cítricos, y la textura del fruto en el durazno (*Prunus persica*); entre otros (Guo *et al.*, 2020). En específico, los polimorfismos de nucleótido único (SNP) corresponden a una variación en un solo nucleótido dentro de una secuencia de ADN que ocurre entre individuos de una población y son, en gran medida, los marcadores más fáciles de determinar y los más útiles y ampliamente aplicados en los estudios genéticos en la era moderna (Johnson, 2009).

Un estudio reciente en pepino (*Cucumis sativus L.*), un cultivo de gran importancia económica, ejemplifica el potencial de los SNP para discriminar entre variedades según el color de piel de los frutos inmaduros, específicamente piel verde claro y piel blanca, un rasgo relacionado con la acumulación de clorofila.

En esta investigación, se identificaron SNPs en regiones clave del genoma vinculadas a esta característica mediante el análisis de QTL-seq, destacando mutaciones en genes como *Chr3CG52930* y *Chr3CG53640*. Para confirmar la precisión de estos, se realizaron análisis por electroforesis, donde se visualizaron las diferencias genotípicas entre variedades, corroborando la asociación de los SNPs con los rasgos fenotípicos de interés (Kishor *et al.*, 2021).

En la identificación de marcadores genéticos asociados a rasgos agronómicos, los SNPs detectados mediante secuenciación de tercera generación han demostrado ser herramientas eficaces (Porubsk & Eichler, 2024). A diferencia de QTLs, que requieren poblaciones segregantes y análisis fenotípicos extensivos, los SNPs pueden identificarse directamente a partir de datos genómicos, permitiendo una discriminación más precisa y rápida entre variedades (Voss-Fels & Snowdon, 2015). La secuenciación de tercera generación ofrece lecturas más largas y una mayor resolución, facilitando la detección de variantes estructurales complejas y mejorando la precisión en la identificación de SNPs relevantes para rasgos como la precocidad en la producción de frutos (Logsdon *et al.*, 2020). Esta tecnología representa una alternativa moderna y precisa frente a metodologías tradicionales, permitiendo avanzar hacia una discriminación varietal más temprana y basada en herramientas moleculares de alta resolución.

1.6. Propuesta de investigación.

Pregunta de investigación: ¿Pueden los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) identificados mediante secuenciación de tercera generación ser utilizados como marcadores moleculares para discriminar entre variedades de cerezo dulce (*Prunus avium*) con distintos niveles de precocidad en la producción de frutos?

Hipótesis: Los SNPs diferenciales identificados mediante secuenciación de tercera generación permiten distinguir genéticamente entre variedades de cerezo dulce con precocidad contrastante.

Objetivo general: Evaluar el potencial de SNPs diferenciales, identificados a partir de datos de secuenciación de tercera generación, como marcadores moleculares para la discriminación varietal basada en la precocidad del cerezo dulce.

Objetivos específicos:

1. Identificar y seleccionar SNPs diferenciales entre variedades de cerezo dulce con precocidad contrastante, a partir del análisis de datos genómicos obtenidos mediante secuenciación de tercera generación, y diseñar partidores específicos para su detección.
2. Validar la capacidad discriminadora de los SNPs seleccionados mediante PCR convencional y qPCR con análisis de fusión de alta resolución (HRM), utilizando material vegetativo de distintas variedades.

II. METODOLOGÍA

2.1. Material biológico.

Como material biológico base, se utilizaron cuatro variedades de cerezo dulce en estadio inmaduro (77 BBCH), dos de ellas correspondientes a variedades tempranas y dos a tardías: Royal Dawn; Royal Lee; Regina y Kordia, respectivamente.

2.2. Recepción de datos y muestras.

Como parte de esta investigación, se utilizaron datos bioinformáticos provenientes del proyecto Fondecyt N°1200718. Estos datos incluyen una sesión del software Integrative Genomics Viewer (IGV) con información de secuenciación correspondiente a las cuatro variedades de cerezo mencionadas en el punto 2.1. La secuenciación fue realizada en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, empleando tecnología de tercera generación (Oxford Nanopore), lo que permitió obtener información tanto genética como epigenética. Para este estudio, se recolectaron muestras de pulpa de frutos inmaduros 24 días después de la plena floración, y el ADN fue extraído utilizando el kit NucleoSpin Plant II de Macherey-Nagel. Seis muestras de ADN extraídas en el marco del proyecto fueron cedidas para esta tesis por el Laboratorio de

Epigenética Vegetal de la Universidad de Concepción: dos de la variedad Royal Dawn, dos de Royal Lee, una de Regina y una de Kordia.

Para verificar la integridad del ADN recibido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X y se visualizó mediante transiluminación ultravioleta (UV). Estas muestras fueron utilizadas en los análisis que requerían mayor resolución analítica y sensibilidad en esta tesis. Se les denominó como ADN "A".

2.3. Extracción de ADN de las variedades de cerezo.

Además de las muestras A, se llevó a cabo otra etapa de extracción de ADN de las cuatro variedades de cerezo dulce. Las muestras fueron tomadas de pulpas de frutos inmaduros (77-BBCH) y se extrajo ADN genómico según protocolo CTAB para frutos, brindado por el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA). El ADN fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X y transiluminador UV. Estas muestras fueron utilizadas para análisis menos exigentes en cuanto a la calidad de ADN. Se les denominó como ADN "B".

2.4. Identificación y selección de regiones con SNPs.

A partir de los datos del mapeo genético recibidos, se procedió a identificar regiones que contuvieran SNPs con potencial discriminativo. Se consideraron regiones candidatas aquellas que tuvieran las siguientes características: 1. Que el o los SNPs se visualicen casi o en su totalidad como una línea continua que abarque las dos variedades ya sea tempranas o tardías. 2. Que no presente alto grado de polimorfismos no deseados en el mapeo genético y alto contenido de CGs en el mapeo epigenético, ya que esto dificulta el diseño de partidores. 3. Que no presente grandes espacios en blanco en el mapeo, ya que estas zonas dan lugar a incertidumbre en los datos.

2.5. Análisis bioinformático de la región seleccionada.

Luego de aplicar estos criterios, se realizó una búsqueda bioinformática respecto a la región seleccionada para determinar qué gen contenía los SNPs identificados. Se utilizó la base de datos Ensembl Plants para localizar el gen en el genoma de *Prunus avium*, y posteriormente se realizaron comparaciones con su homólogo en *Prunus persica* utilizando UniProt, STRING y KEGG.

2.6. Diseño de partidores.

Se diseñaron partidores específicos para las regiones con SNPs siguiendo los parámetros del método Temperature Switch PCR (TSP) de Tabone *et al.* (2009),

y utilizando la herramienta bioinformática PrimerBLAST de NCBI (link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

2.7. Validación de partidores.

La etapa de validación de los partidores diseñados se llevó a cabo utilizando PCR convencional. Se amplificó mediante PCR cada set de partidores por separado ajustando el protocolo para la temperatura de fusión (T_m) específica de cada uno. Se promediaron las T_m de cada par de partidores (FL-RL y FC-RC) y se probaron temperaturas desde los 5°C menos que la T_m promediada. La mezcla de reacción para PCR consistió en un volumen final de 12 μ L, que contenía aproximadamente 25 ng de ADN, Buffer de PCR Colorless 1X, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.012 μ M de partidador F y 0.012 μ M de partidador R, 0.1 U de Taq polimerasa y agua ultrapura hasta completar el volumen final. Las condiciones de ciclo térmico fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de la fase de amplificación que constó de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, T_m específica de los partidores por 1 minuto y 72°C por 30 segundos, por último, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE 1X a 75V durante 45 minutos para visualizar los productos PCR a través de un transiluminador UV.

2.8. Análisis de SNPs mediante PCR y qPCR-HRM.

Para analizar las variantes estructurales, específicamente los SNPs encontrados, se utilizaron las técnicas de PCR con los parámetros descritos en el punto 2.8.1 y qPCR con High Resolution Melting (qPCR-HRM) descritas en el punto 2.8.3.

2.8.1. Análisis por PCR convencional.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 12 μ L. La mezcla de reacción contenía aproximadamente 25 ng de ADN, Buffer de PCR Colorless 1X, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.004 μ M de partidor FL, 0.02 μ M de partidor FC, 0.02 μ M de partidor R, 0.1 U de Taq polimerasa y agua ultrapura hasta completar el volumen final. Las condiciones de ciclo térmico fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de una primera fase de amplificación que consta de 15 ciclos de 95°C por 30 segundos, T_m específica de los partidores largos por 30 segundos y una extensión de 72°C por 1 minuto. Luego, una segunda fase de amplificación de 5 ciclos de 95°C por 10 segundos y 45°C por 30 segundos y finalmente, una tercera fase de amplificación de 15 ciclos de 95°C por 10 segundos, T_m específica de los partidores cortos por 30 segundos y una extensión 72°C por 5 segundos (Tabone *et al.*,2009). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE 1X a 75V durante 45 minutos, para luego visualizar los productos PCR en un transiluminador UV.

2.8.2. Evaluación del efecto del método de extracción y diluciones de ADN en el análisis qPCR-HRM.

Para evaluar el efecto del método de extracción y de las diluciones de los tipos de ADN utilizados en los análisis de qPCR-HRM, se realizaron diluciones seriadas 1:1, 1:10 y 1:100 para los dos tipos de ADN trabajados (A y B) de las variedades Royal Lee (variedad temprana) y Regina (variedad tardía). Luego se realizó un qPCR-HRM para analizar las variaciones en las T_m . La mezcla de reacción y condiciones del ciclo térmico fueron las mismas utilizadas posteriormente en los análisis qPCR-HRM detalladas en el punto 2.8.3.

2.8.3. Análisis por qPCR-HRM.

Los conjuntos de partidores previamente validados mediante PCR convencional fueron evaluados mediante qPCR-HRM para detectar las diferencias en las curvas de fusión correspondientes a los SNPs presentes en las muestras analizadas, utilizando en cada caso los partidores FL-RC, con el objetivo de abarcar múltiples SNPs por región amplificada. El análisis se realizó con ADN A de cada variedad trabajada, en duplicado técnico. La mezcla de reacción contenía aproximadamente 20 ng de ADN, 10 μ L de Mix qPCR 2X, 0.6 μ L de partidore forward de 0.4 μ M, 0.6 μ L de partidore reverse de 0.4 μ M y agua ultrapura hasta completar el volumen final. Las condiciones del ciclo térmico fueron las

siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, Tm de partidores por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Luego de esto las muestras se calentaron gradualmente desde 70°C hasta 85°C, aumentando la temperatura en incrementos de 0.025°C por segundo. Durante este proceso, se registró la liberación de fluorescencia, lo que permitió la construcción de las curvas de fusión para el análisis de polimorfismos.

2.9. Extrapolación de resultados a variedades no analizadas in silico.

Una vez establecidos los métodos discriminatorios entre variedades tempranas y tardías, se procedió a la extrapolación de estos utilizando material vegetativo de nuevas variedades. Esto es crucial para confirmar la eficacia de los perfiles como modelos predictivos para la clasificación de variedades de cerezo según su precocidad en la producción de frutos.

2.9.1. Recepción de material vegetativo.

Se recibieron muestras de hojas provenientes del INIA Rayantué, recolectadas de árboles de variedades tempranas y tardías, las cuales fueron congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso. Las variedades fueron: Brooks, Cristobalina y Mini Royal, correspondientes a variedades tempranas, y Sweetheart, Staccato y Schndneider, correspondientes a variedades tardías.

Estas muestras se procesaron para la extracción de ADN genómico utilizando el kit NucleoSpin Plant II de Macherey-Nagel, y se les denominó como ADN "C".

2.9.2. Amplificación y análisis de SNPs.

Las muestras vegetativas se analizaron utilizando los conjuntos de partidores validados y técnicas descritas previamente para corroborar su aplicabilidad. Los datos obtenidos se compararon con los obtenidos previamente de frutos para evaluar la consistencia y precisión de los métodos predictivos ya descritos.

III. RESULTADOS

3.1. Verificación de la integridad del ADN genómico (A) mediante electroforesis en gel.

La evaluación de la integridad del ADN genómico A mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 3.1) reveló bandas definidas y de alta intensidad en cuatro de las muestras analizadas, correspondientes a las variedades tempranas, comparables al control de ADN lambda y al control positivo utilizado como referencia (ADN B de la variedad Royal Lee), de concentración aproximada 120 ng/ μ L. En las otras dos muestras, correspondientes a las variedades tardías, se observó una ligera disminución en la intensidad de las bandas, sugiriendo una menor concentración de ADN en estas. No se detectaron bandas difusas, lo que indica que no hubo fragmentación o degradación significativa del ADN en ninguna de las muestras evaluadas. Estos resultados confirman que la calidad del ADN A es adecuada para análisis posteriores.

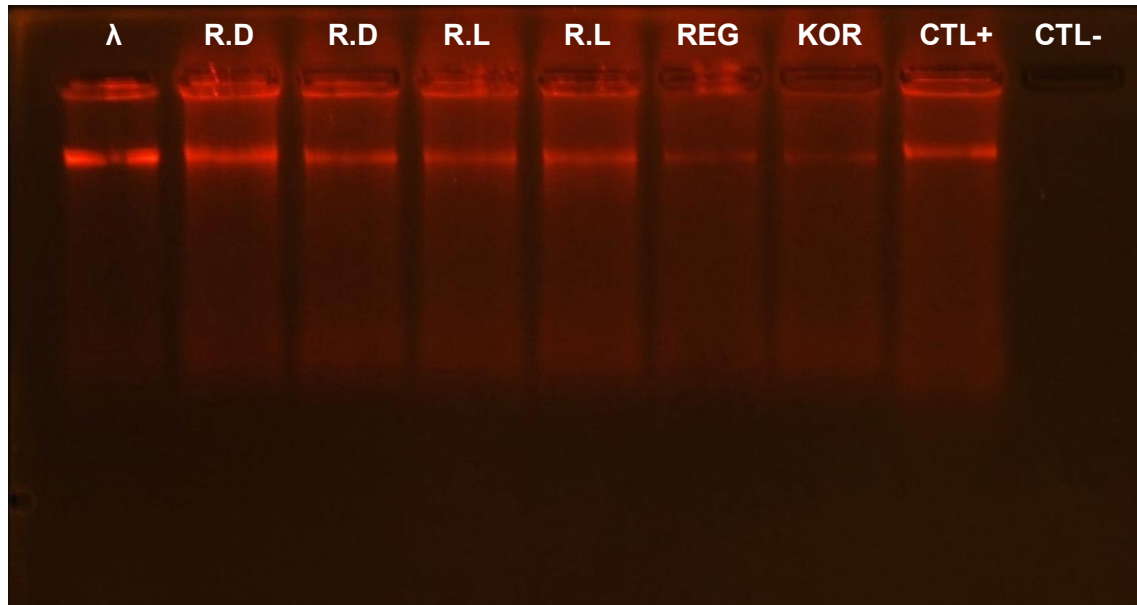


Figura 3.1 Evaluación de la integridad de ADN genómico “A” de las variedades Royal Dawn, Royal Lee, Regina y Kordia, respectivamente, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 75V por 45min. λ: ADN lambda; R.D: Royal Dawn; R.L: Royal Lee; REG: Regina; KOR: Kordia; CTL+: Royal Lee de muestras B como control positivo; CTL-: control negativo.

3.2. Extracción de ADN genómico (B).

Como resultado de la etapa de extracción de ADN se obtuvieron cuatro muestras con un volumen final de 100 μ L. Se midió la concentración de estas mediante espectrofotómetro Epoch, siendo de aproximadamente 120 ng/ μ L para las variedades tempranas y 80 ng/ μ L para las tardías. Mediante electroforesis en gel de agarosa se visualizaron bandas definidas de alto peso molecular para cada una de las variedades trabajadas (Fig. 3.2), y en tres de ellas (R.L; REG y KOR) se visualizó una leve cantidad de ARN residual, evidenciado por bandas difusas en la región de bajo peso molecular (<250 pb), sin embargo, no en cantidades

suficientes para interferir con los análisis posteriores. Estos resultados confirman que la calidad del ADN B es adecuada para análisis menos exigentes, específicamente, estas muestras fueron utilizadas para la etapa de validación de partidores y optimización de protocolos.

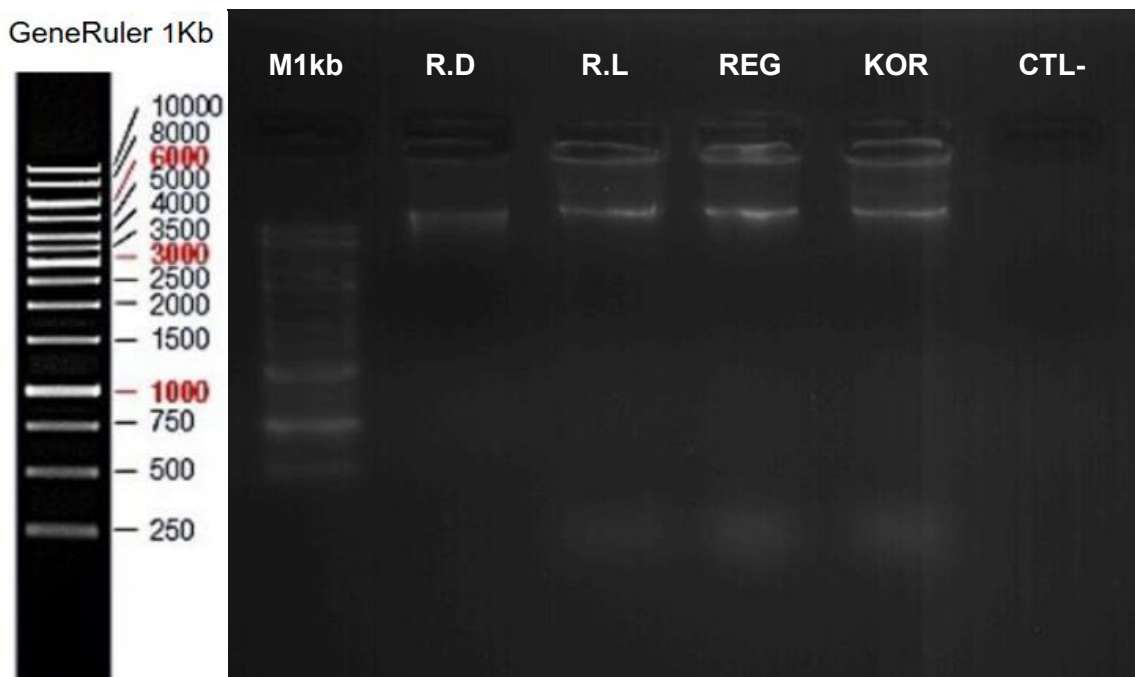


Figura 3.2 Evaluación de la integridad de ADN genómico “B” de las variedades Royal Dawn, Royal Lee, Regina y Kordia, respectivamente, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 70V por 40min. R.D: Royal Dawn; R.L: Royal Lee; REG: Regina; KOR: Kordia; CTL-: control negativo; M1kb: Marcador de peso molecular de 1kb.

3.3. Identificación y selección de regiones con SNPs.

Como resultado de la identificación y selección de regiones candidatas en el genoma, se identificaron tres regiones con SNPs (Fig. 3.3) y se seleccionó la primera de ellas, la cual contiene múltiples SNPs en las variedades tardías (Fig. 3.3a). Las regiones 3b y 3c fueron descartadas por motivos de alto contenido de CGs en la secuencia y espacios en blanco en el mapeo que dan lugar a incertidumbre en los datos, respectivamente.

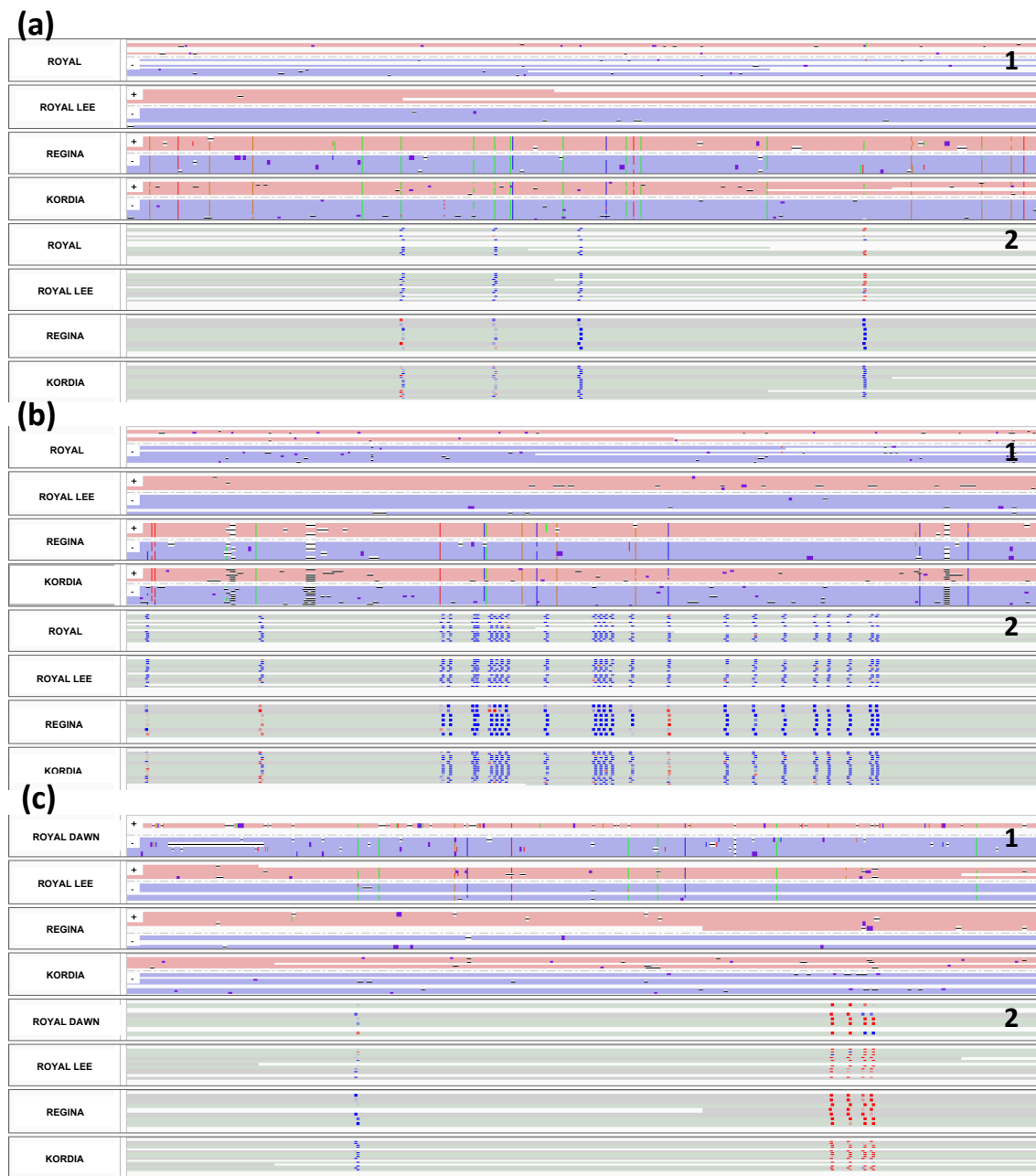


Figura 3.3 Ventana de IGV de las regiones identificadas. Mapeos genéticos y epigenéticos de las variedades tempranas Royal Dawn y Royal Lee y las variedades tardías Regina y Kordia. (a) Primera región: seleccionada, con SNPs en variedades tardías; (b) Segunda región: no seleccionada, con SNP en variedades tardías; (c) Tercera región: no seleccionada, con SNPs en variedades tempranas. 1. Capa genética, muestra las VE. 2. Capa epigenética, muestra los CG metilados (rojo) y los CG no metilados (azul).

3.4. Análisis bioinformático de la región seleccionada.

A partir del análisis en la base de datos Ensembl Plants, se identificó que el gen que contiene los SNPs seleccionados corresponde a una secuencia codificante de tipo proteína (protein-coding gene). Esta presenta dominios funcionales conservados, incluyendo dimetilaliltransferasa e IPP transferasa, relacionados con funciones preniladoras en plantas. Se observó un alto grado de conservación con ortólogos en especies del mismo género y otros frutales de carozo, destacando su ortología con el gen IPT (PRUPE_4G170400) en *Prunus persica* (97.38% de identidad).

La caracterización funcional del gen ortólogo en *P. persica* (UniProt ID: M5X0L4), indica que codifica una tRNA dimethylallyltransferase, enzima que transfiere un grupo dimetilalilo al nucleótido adenosina-37 del tRNA, formando N6-dimetilaliladenosina-37, según lo registrado en la base Rhea (Rhea:26482). Según datos de UniProt, esta proteína participa en la modificación post-transcripcional del tRNA y en la biosíntesis de citoquininas, presentando como funciones moleculares principales la actividad tRNA dimethylallyltransferasa y la unión a ATP. La secuencia pertenece a la familia IPPT (Pfam: PF01715), lo que evidencia su conservación funcional en *Prunus*. El análisis de interacciones funcionales mediante STRING mostró asociaciones con otras proteínas de la familia IPP transferasa y con enzimas preniladoras como FPPS y GGPS,

implicadas en la síntesis de precursores de hormonas vegetales (Fig. 3.4). En la base de datos KEGG, el gen se encuentra anotado como tRNA dimethylallyltransferase (EC 2.5.1.75) dentro de la ruta “Zeatin biosynthesis” (pper00908), participando en la formación de prenyl-tRNA, precursor clave en la síntesis de citoquininas (Fig. 3.5).

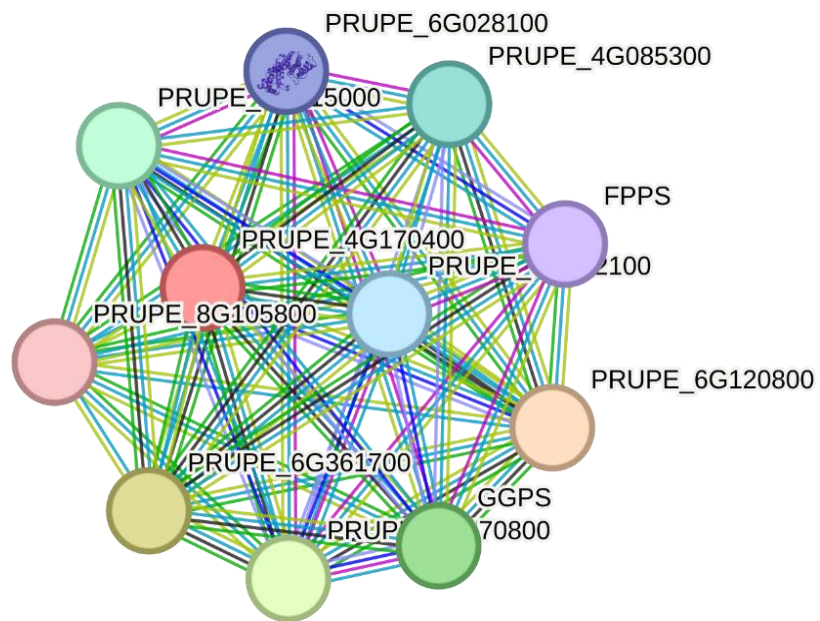


Figura 3.4 Red de proteínas extraída de STRING. Se muestra la proteína de interés PRUPE_4G170400 en Prunus persica, resaltando sus asociaciones funcionales con otras proteínas de la familia IPP transferasa y con enzimas preniladoras como FPPS y GGPS, las cuales están implicadas en la síntesis de precursores de hormonas vegetales.

3.5. Diseño de partidores.

Como resultado del diseño de partidores, se diseñaron cuatro conjuntos de partidores conformados por forward largo (FL), forward corto (FC), reverse corto (RC) y reverse largo (RL), donde el SNP queda situado en el extremo 3' del partidador FC. Además, a todos los partidores cortos (tanto forward como reverse) se les agregó una cola no complementaria de GGC- en el extremo 5' para aumentar su temperatura de melting (T_m) global con el fin de mejorar la capacidad de los partidores cortos para competir con los partidores largos participando eficientemente en la primera etapa de amplificación. Se diseñaron partidores tanto a partir de la secuencia consenso de las variedades tempranas como de las tardías por separado. Cabe destacar que, debido a los estrictos criterios del método TSP para el diseño, algunos cebadores fueron empleados en más de un conjunto al ser las únicas secuencias viables que cumplían simultáneamente con estos requisitos. El detalle se muestra en la tabla a continuación:

Tabla 3.1. Detalle de cada uno de los partidores diseñados. En color azul se destaca la cola no complementaria en el extremo 5' de los partidores cortos. En color rojo se destacan los SNPs contenidos en el extremo 3' del partidador forward corto. TP: temprana; TD: tardía.

Tipo de variedad	Partidor	Secuencia 5' → 3'	Amplicón (pb)
------------------	----------	-------------------	---------------

Temprana	TP1 FL	TGTTATAATCAAGCTTGCCTTCAATGA	FL↔RL= 352
Temprana	TP1 FC	GGCCCAAACGAATGATAATT	FC↔RC= 182
Temprana	TP1 RC	GGCATATCAAACAAAATCACTT	FL↔RC= 274
Temprana	TP1 RL	GCAAGCACCTGTCTATCACCTGG	
Temprana	TP2 FL	AGTATGGAGAGTTTGGTTTATTGGGT	FL↔RL= 449
Temprana	TP2 FC	GGCTCCAAACGAATGATAATT	FC↔RC= 137
Temprana	TP2 RC	GGCGTTATAAGCATAAACAAAA	FL↔RC= 358
Temprana	TP2 RL	GCAGATCCAACATCAAGTCCCCG	
Tardía	TD1 FL	TGTTATAATCAAGCTTGCCTTCAATGA	FL↔RL= 457
Tardía	TD1 FC	GGCTCCAAACAAATGATAAAC	FC↔RC= 313
Tardía	TD1 RC	GGCATTAAATTTCAATGGTAGAT	FL↔RC= 404
Tardía	TD1 RL	TGGCATACAATGCAACTGAAACAA	
Tardía	TD2 FL	AGTATGGAGAGTTTGGTTTATTGGGT	FL↔RL= 588
Tardía	TD2 FC	GGCCCAAACAAATGATAAAC	FC↔RC= 182
Tardía	TD2 RC	GGCATATCAAACAAAATCACTT	FL↔RC= 404
Tardía	TD2 RL	ATGGCATACAATGCAACTGAAACAA	

3.6. Validación de partidores.

La etapa de validación de los partidores diseñados se llevó a cabo utilizando PCR convencional con muestras de ADN B. Se promediaron las T_m de cada par de partidores y sus combinaciones (FL↔RL; FC↔RC y FL↔RC), se probaron aquellas temperaturas que rondaban la T_m promediada. Además, se realizaron gradientes de temperatura a aquellos pares de partidores que presentaron resultados no convincentes en la primera etapa. Una vez realizado esto, se seleccionaron aquellas temperaturas que resultaron en una amplificación específica, es decir, la visualización de una sola banda definida. Por otra parte, se descartaron aquellos pares de partidores que presentaron una amplificación no específica, es decir, la presencia de dos o más bandas. A la par de esto, se validó que el tamaño del amplicón coincidiera con el esperado. Finalmente, los resultados obtenidos se organizaron en una tabla, la cual indica aquellos pares de partidores validados, junto con la T_m final y el tamaño del amplicón en pares de bases (pb) correspondiente para cada uno (Tabla 2).

Tabla 3.2. Resultado de la validación de T_m y tamaño del amplicón de cada par de partidores.

Pares de partidores	T_m final (°C)	Amplicón (pb)
TP1 FL↔RL	63	352
TP1 FL↔RC	58	182

TP2 FL↔RL	62	449
TP2 FC↔RC	53	137
TD1 FL↔RL	58	457
TD1 FC↔RC	54	313
TD1 FL↔RC	58	404
TD2 FC↔RC	55	182
TD2 FL↔RC	62	404

3.7. Optimización del sistema de partidores.

Para evaluar la eficacia y precisión del diseño de partidores, se realizaron amplificaciones por PCR utilizando los conjuntos de partidores TP2 y TD1, con ADN de una variedad temprana (Royal Lee) y una tardía (Regina), provenientes de las muestras B. Cada conjunto se probó en dos configuraciones: (1) una estándar con el juego completo de partidores (FL+FC+RC+RL) y (2) una modificación que excluyó el partidador reverse largo (FL+FC+RC). Los resultados revelaron que la configuración estándar generó amplificaciones inespecíficas en el gel de agarosa, atribuibles a interacciones cruzadas entre los partidores y/o formación de dímeros (Fig. 3.6). En contraste, la configuración optimizada (sin RL) produjo un patrón de bandas nítidas y específicas, con amplicones de tamaño

acorde al esperado: una banda correspondiente a la amplificación con los partidores internos (FC↔RC) en presencia del SNP, y una banda de control (FL↔RC) que validó la eficiencia del ensayo. Este comportamiento fue particularmente evidente en el conjunto TD1, donde la exclusión del partidor RL resolvió las interferencias y permitió una interpretación clara de los resultados (Fig. 3.6b). En el caso del conjunto TP2, no se observó la banda esperada de 358pb, correspondiente al producto de FL↔RC, en ninguna de las dos configuraciones (Fig. 3.6a). Sin embargo, un posterior reemplazo en el partidor RC restableció la amplificación exitosa de ambos amplicones (FL↔RC y FC↔RC). Estos resultados demuestran que la optimización del diseño de cebadores mediante la omisión del partidor RL mejora la especificidad del ensayo TSP, reduciendo la aparición de productos no deseados y facilitando la identificación precisa de SNPs.

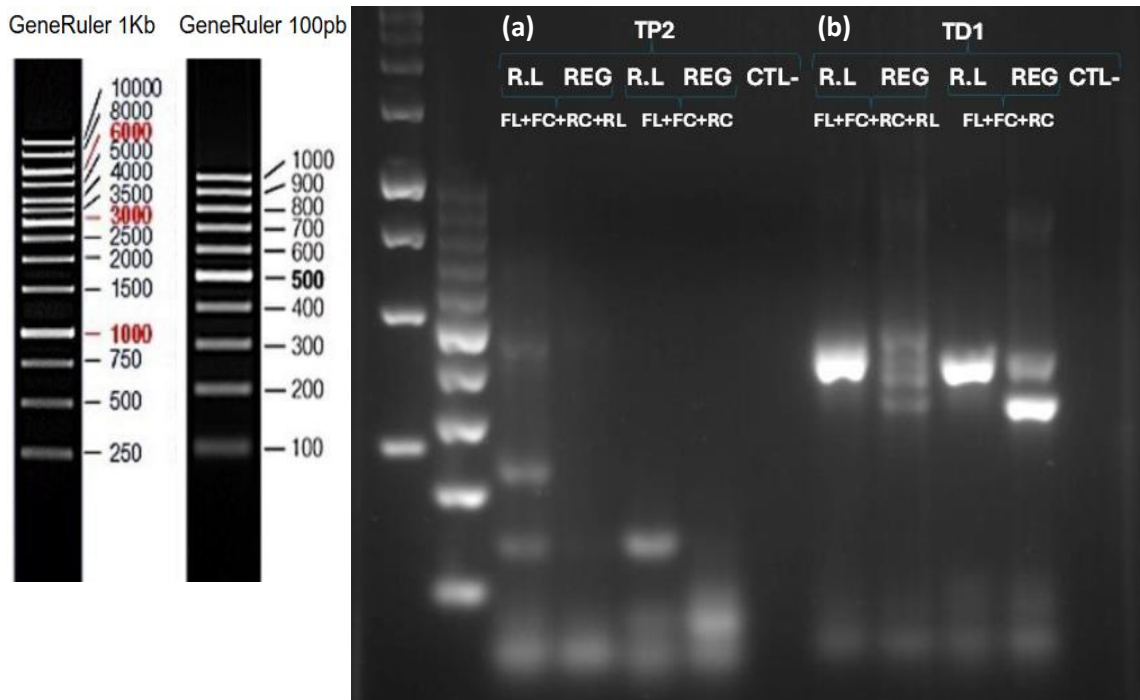


Figura 3.6 Amplificación PCR de los conjuntos de partidores TP2 (a) y TD1 (b) visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 75V por 45min, utilizando ADN "B". Cada conjunto contiene las dos configuraciones evaluadas, estándar: FL+FC+RC+RL y optimizada: FL+FC+RC. R.L: Royal Lee; REG: Regina; CTL-: control negativo; M1kb: Marcador de peso molecular de 1kb; M100pb: Marcador de peso molecular de 100pb.

Tras el proceso de validación y optimización del sistema de partidores, se establecieron tres configuraciones finales de partidores con potencial de discriminación entre variedades tempranas y tardías de *Prunus avium* (Tabla 3). Estas combinaciones incluyen: (1) el conjunto TD1 previamente validado (TD1 FL+FC+RC), que demostró óptimo desempeño en etapas iniciales; (2) la combinación TP2-TP1, donde al conjunto TP2 se le reemplazó su RC por el partidador RC de TP1; y (3) la combinación TD2-TD1, donde al conjunto TD2 se le

reemplazó su FL por el partidador FL de TD1. El detalle se puede observar en la tabla a continuación:

Tabla 3.3. Conjuntos definitivos de partidores para los análisis posteriores. En color rojo se destacan los partidores que fueron incluidos en los nuevos conjuntos.

Conjunto	Partidor FL	Partidor FC	Partidor RC	Amplicones esperados (pb)
TP2-TP1	TP2	TP2	TP1	FL↔RC= 404; FC↔RC= 183
TD1	TD1	TD1	TD1	FL↔RC= 404; FC↔RC= 313
TD2-TD1	TD1	TD2	TD2	FL↔RC= 274; FC↔RC= 182

3.8. Análisis de SNPs mediante PCR.

Los resultados de los análisis de SNPs mediante PCR mostraron un patrón de amplificación claro y específico para los tres conjuntos definidos (Fig. 3.7). En el caso del conjunto TP2-TP1, se observó un patrón de amplificación consistente con lo esperado (Fig. 3.7b). En las variedades tardías (Regina y Kordia), que carecen del SNP de interés, se observó exclusivamente la banda control de 404pb correspondiente a la amplificación con los partidores FL↔RC y en la variedad temprana (Royal Lee), portadora del SNP, se detectaron ambas bandas: la de 404 pb (FL↔RC) y la banda específica de 183 pb (FC↔RC), esta última generada únicamente cuando el partidador FC reconoce la secuencia que contiene

el polimorfismo. En el conjunto TD1 se observaron amplificaciones concordantes con lo esperado (Fig. 3.7c), con una banda intensa de 313 pb correspondiente al producto de los partidores FC↔RC en la variedad tardía (Regina), confirmando la presencia del SNP, a la vez que se detectó la banda control de 404 pb (FL↔RC) con menor intensidad. Por el contrario, en la variedad temprana (Royal Lee) solo se visualizó la banda de 404 pb (FL↔RC), indicando la ausencia del SNP. Y por último en el conjunto TD2-TD1 también mostró las amplificaciones esperadas (Fig. 3.7d), con una única banda intensa de 274 pb (FL↔RC) en la variedad temprana (Royal Lee), correspondiente a la banda control, mientras que en las variedades tardías (Regina y Kordia) se pueden observar ambas bandas: una banda control de leve intensidad en los 274 pb (FL↔RC) y la banda indicadora de la presencia del SNP en los 182 pb (FC↔RC). Estos resultados validan el potencial discriminatorio de estos conjuntos de partidores para identificar la presencia o ausencia del SNP de interés en las diferentes variedades de *Prunus avium*.

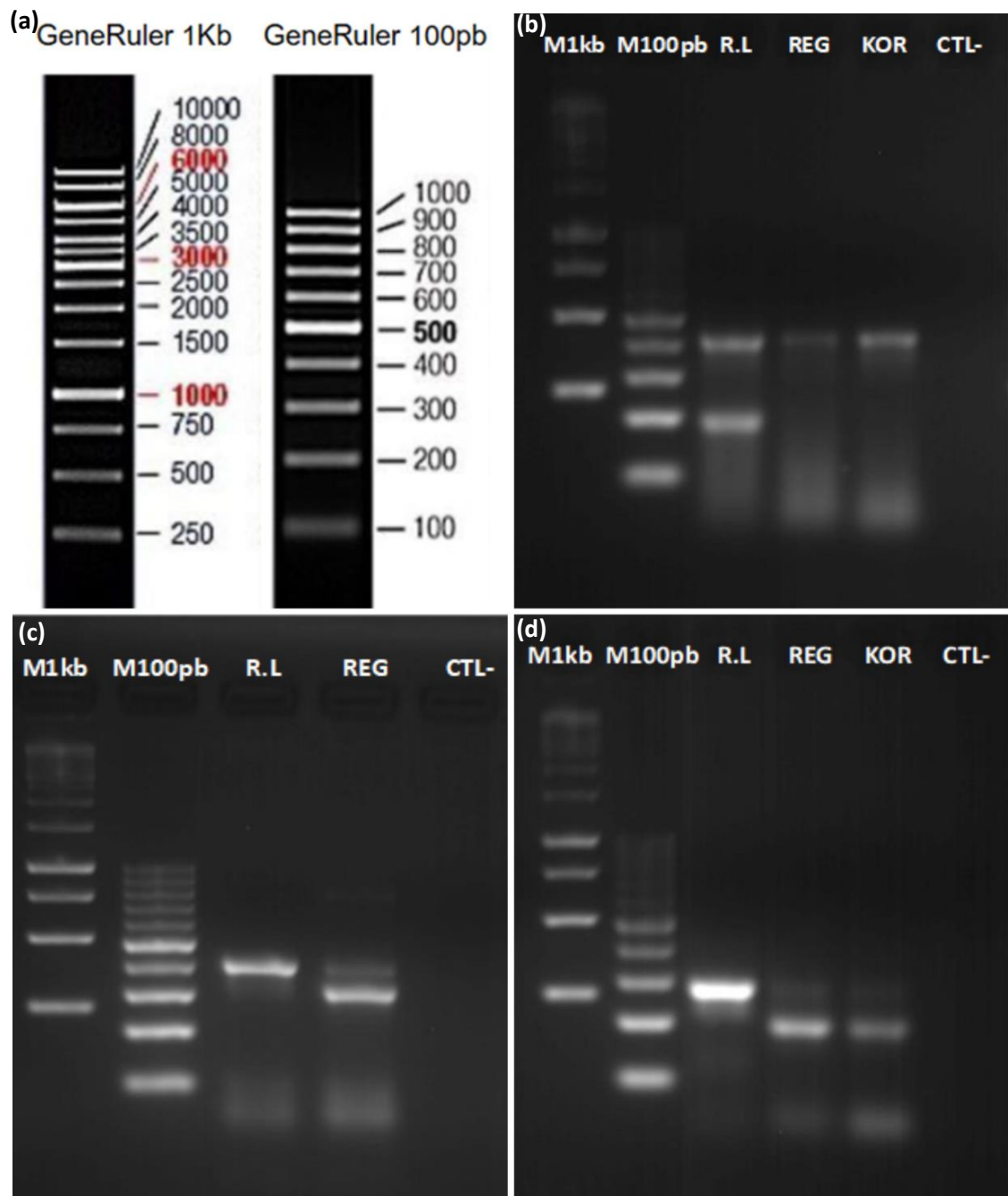


Figura 3.7 Resultado PCR de los conjuntos de partidores visualizado en gel de agarosa al 2% a 75V por 45min, utilizando ADN "B". (a) Marcadores de peso molecular (GeneRuler 1Kb/100pb); (b) Conjunto de partidores TP2-TP1; (c) Conjunto de partidores TD1; (d) Conjunto de partidores TD2-TD1; M1kb: marcador de peso molecular de 1kb; M100pb: marcador de peso molecular de 100pb; R.L: Royal Lee; REG: Regina; KOR: Kordia; CTL-: control negativo.

3.9. Evaluación del efecto del método de extracción y diluciones del ADN en el análisis qPCR.

Como resultado de la evaluación del efecto del método de extracción y diluciones del ADN, se pudo observar que los perfiles de disociación obtenidos mediante qPCR-HRM mostraron diferencias sutiles pero consistentes en las T_m entre los tipos de ADN (A y B) y las variedades analizadas (Royal Lee y Regina). En la variedad Royal Lee, las T_m se mantuvieron relativamente estables en todas las diluciones (Tabla 4). El ADN A presentó variaciones de $0.15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.03\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre diluciones, mientras que el ADN B mostró variaciones de $0.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.08\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al comparar entre métodos de extracción, las T_m también fueron estables, con diferencias mínimas de $0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.05\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las diluciones 1:1, 1:10 y 1:100, respectivamente. En la variedad Regina, se observó un comportamiento similar en el ADN A, con variaciones de $0.15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.08\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre diluciones. En cambio, el ADN B mostró un leve aumento en la variabilidad, con diferencias de $0.34\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.12\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre diluciones, y de $0.09\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0.28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0.32\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre métodos de extracción. Estas diferencias se reflejaron visualmente en las curvas de melting (Fig. 3.8): las líneas roja y morada (dilución 1:1) mostraron perfiles prácticamente superpuestos; las líneas naranja y celeste (1:10) presentaron una ligera separación, y las líneas amarilla y verde (1:100) una mayor divergencia, especialmente en el ADN B de Regina. Como se indica en la Tabla 4, el método de extracción y la dilución del ADN no generaron un impacto significativo en las

T_m, ya que las variaciones se mantuvieron en torno a los 0.15 °C. No obstante, considerando que el ADN B de la variedad Regina presentó mayores discrepancias, se estableció un umbral conservador de ±0.2 °C como criterio de confianza para futuras clasificaciones varietales mediante HRM. Este margen permitirá diferenciar entre variaciones técnicas (derivadas del método o la dilución) y diferencias genéticas reales entre variedades.

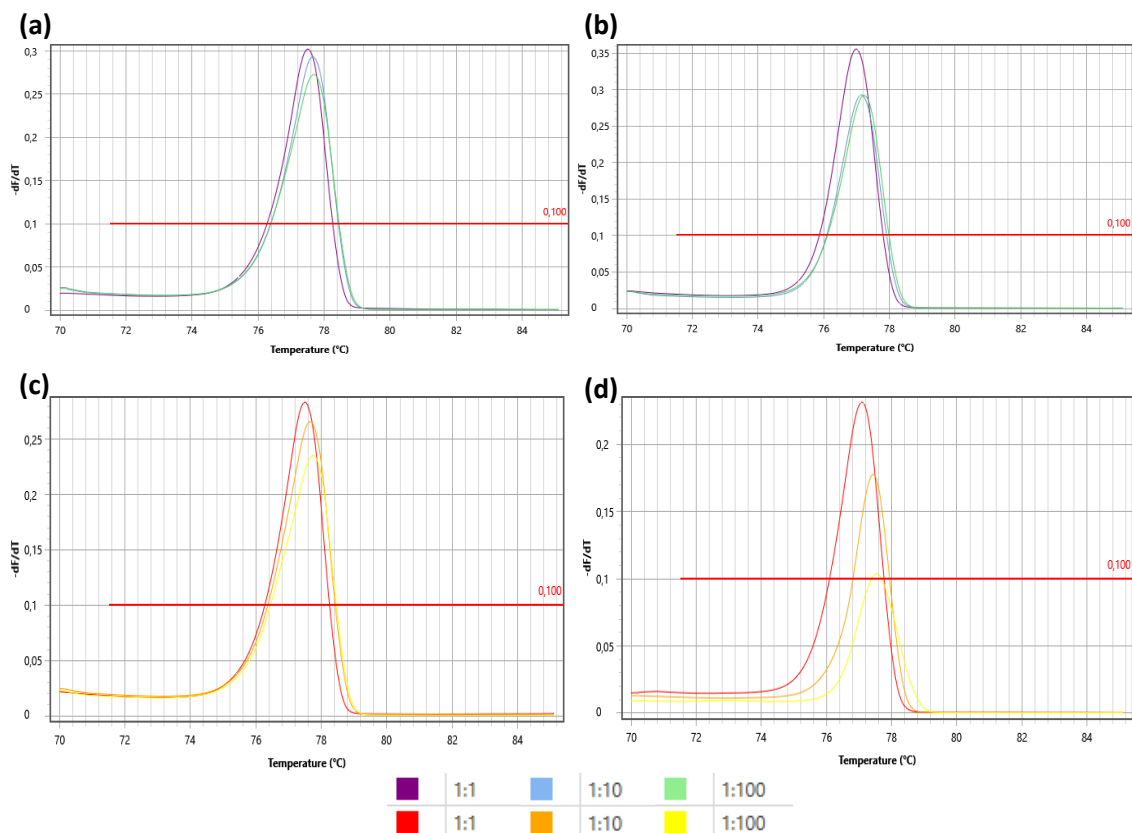


Figura 3.8 Perfiles de HRM de ADN "A" y "B" de las variedades Royal Lee y Regina obtenidos mediante qPCR. Las curvas representan las diluciones seriadas (1:1, 1:10, 1:100) para cada tipo de ADN: curva morada y roja (1:1), celeste y naranja (1:10), verde y amarilla (1:100). (a) Royal Lee con ADN "A"; (b) Regina con ADN "A"; (c) Royal Lee con ADN "B"; (d) Regina con ADN "B".

Tabla 3.4. Tm obtenidas por qPCR-HRM a partir de los ADN "A" y "B" para las variedades Royal Lee (R.L) y Regina (REG) en función del método de extracción y dilución (1:1; 1:10 y 1:100).

Dilución/ADN	R.L (A)	R.L (B)	REG (A)	REG (B)
1:1	77.50°C	77.49°C	76.99°C	77.08°C
1:10	77.65°C	77.65°C	77.14°C	77.42°C
1:100	77.68°C	77.73°C	77.22°C	77.54°C

3.9.1. Análisis de SNPs mediante qPCR-HRM.

Se procedió a realizar los análisis de SNPs mediante qPCR-HRM. Durante la fase preliminar, se descartó el conjunto TD1 debido a un perfil de fusión no específico, caracterizado por dos temperaturas de melting bien definidas (~78 °C y ~80 °C), indicativas de productos inespecíficos. Por lo tanto, se continuó el análisis con los conjuntos TP2-TP1 y TD2-TD1.

El análisis del conjunto de partidores TP2-TP1 permitió diferenciar eficientemente las cuatro variedades estudiadas, mostrando patrones de amplificación y fusión característicos para cada genotipo (Fig. 3.9). Las curvas de amplificación (Fig. 3.9a) mostraron patrones cinéticos diferenciados entre variedades: Royal Lee y Royal Dawn exhibieron una fase exponencial más abrupta y mesetas más altas

que Kordia y Regina, sugiriendo mayor abundancia inicial del target. Los parámetros de eficiencia de PCR fueron adecuados (0.86–0.89) y los coeficientes de correlación (R^2) fueron consistentemente altos (≥ 0.99999). Los valores de C_q confirmaron la variabilidad entre genotipos: Royal Lee mostró el valor más bajo (20.34 ± 0.03), seguido de Royal Dawn (20.96 ± 0.06), mientras que Regina (23.59 ± 0.13) y Kordia (23.77 ± 0.03) requirieron un mayor número de ciclos para alcanzar el umbral de detección (threshold) (Fig. 3.9b). Esta variación en los C_q sugiere diferencias en la cantidad de ADN inicial o en la eficiencia de unión de los partidores entre variedades.

El análisis HRM (Fig. 3.9c) mostró patrones de fusión distintivos para cada variedad, con Royal Dawn y Royal Lee exhibiendo transiciones a temperaturas más altas ($\sim 77.6^\circ\text{C}$) comparadas con Regina (REG) y Kordia (KOR) ($\sim 77.1^\circ\text{C}$). Las diferencias en la pendiente de las curvas sugieren variaciones en la estabilidad térmica de los amplicones, consistente con polimorfismos en la secuencia diana. El análisis de la curva de melting complementó estos hallazgos (Fig. 3.9d), revelando perfiles térmicos diferenciados. Royal Dawn y Royal Lee mostraron temperaturas de fusión similares ($77.62\text{-}77.65^\circ\text{C}$), significativamente más altas que Regina y Kordia ($77.16^\circ\text{C}\text{-}77.18^\circ\text{C}$) (Tabla 5). Estas variaciones térmicas son indicativas de polimorfismos en la región amplificada, y su reproducibilidad fue alta entre réplicas ($\Delta T_m < 0.02^\circ\text{C}$; $\sigma \leq 0.03$).

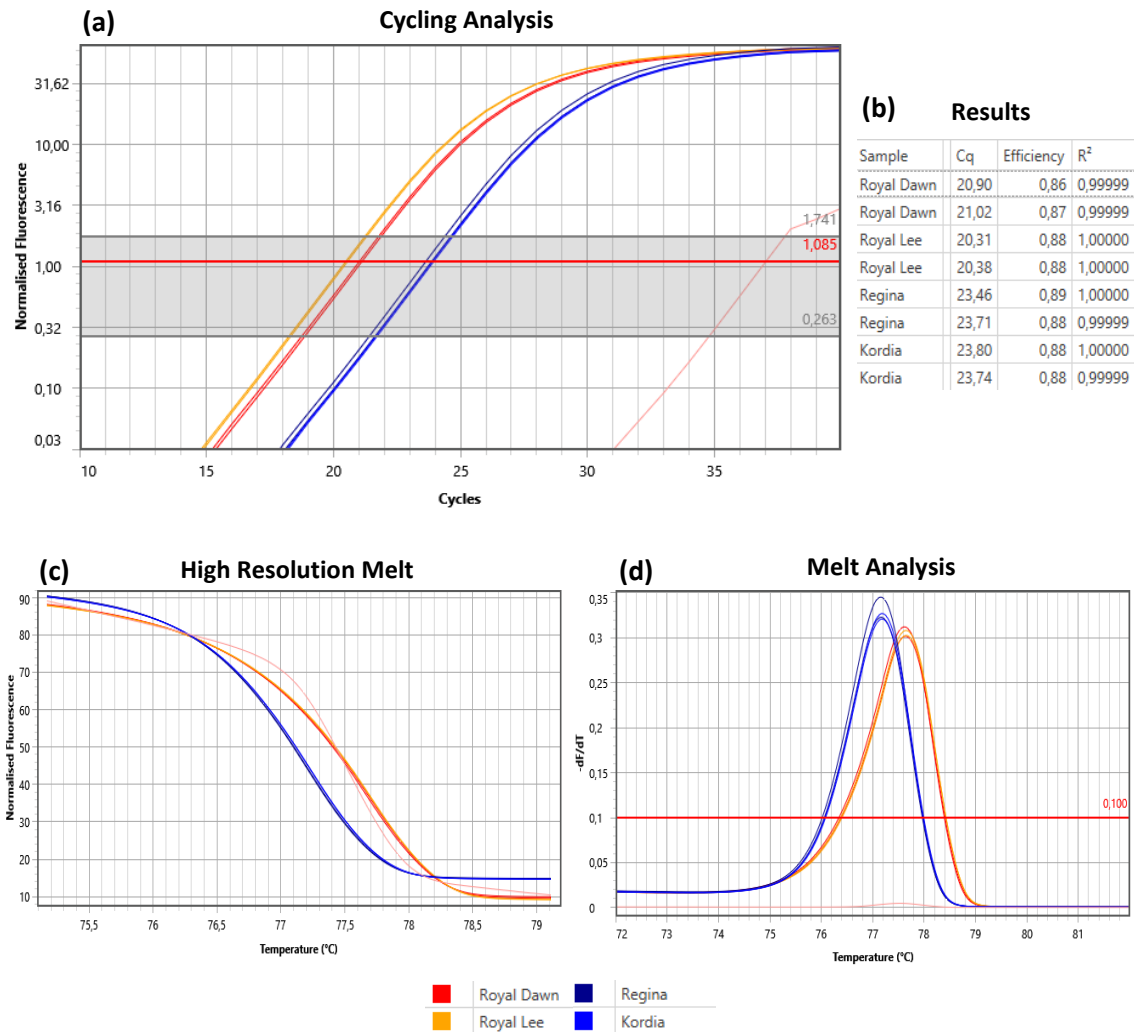


Figura 3.9 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN “A” para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TP2-TP1. (a) Curva de amplificación: Fluorescencia normalizada vs ciclos. Línea roja horizontal indica el threshold para determinación de Cq; (b) Resultados cuantitativos de la curva de amplificación; (c) Análisis de High Resolution Melting (HRM): Curvas de fusión normalizadas en rango estrecho (75-79°C); (d) Curva de Melt derivada (-dF/dT) mostrando picos de temperatura de fusión (Tm).

Tabla 3.5. Tm obtenidas a partir del HRM para el conjunto de partidores TP2-TP1 para las cuatro variedades analizadas, utilizando ADN “A”.

Variedad	Tm (°C)

Royal Dawn	77.61
Royal Dawn	77.63
Royal Lee	77.65
Royal Lee	77.64
Regina	77.15
Regina	77.16
Kordia	77.18
Kordia	77.18

Por otro lado, el análisis del conjunto de partidores TD2–TD1 permitió la correcta discriminación de las cuatro variedades evaluadas (Fig. 3.10). La curva de amplificación (Fig. 3.10a) mostró diferencias marcadas en la cinética de la PCR: Royal Lee y Royal Dawn alcanzaron el umbral de detección significativamente antes (alrededor del ciclo 18), en comparación con Regina y Kordia (ciclo 21). Las curvas presentaron fases exponenciales bien definidas con pendientes homogéneas y transiciones suaves hacia la fase de meseta, en concordancia con las eficiencias observadas (87–89%), lo que indica una amplificación eficiente y libre de inhibidores. Los valores de C_q reflejan estas diferencias cinéticas (Fig. 3.10b): Royal Lee mostró la amplificación más temprana (C_q = 18.22 ± 0.01), seguida por Royal Dawn (18.86 ± 0.08), mientras que Regina (21.15 ± 0.11) y

Kordia (21.28 ± 0.08) presentaron valores significativamente más altos. Todos los ensayos mantuvieron parámetros técnicos dentro del rango óptimo (eficiencia entre 87–89% y $R^2 \geq 0.99999$), confirmando la solidez del sistema.

El análisis HRM (Fig. 3.10c) reveló perfiles de fusión distintivos para cada variedad. Royal Dawn y Royal Lee presentaron curvas similares, con sutiles diferencias en la pendiente alrededor de los 77 °C. Por su parte, Regina y Kordia mostraron perfiles de desnaturalización claramente diferentes, caracterizados por un inicio de fusión más temprano (~76 °C) y transiciones más graduales, lo cual sugiere una menor estabilidad térmica del amplicón en estas variedades. El gráfico de melting derivado (Fig. 3.10d) fue particularmente revelador, ya que permitió visualizar con claridad los máximos de fusión de cada genotipo. Royal Lee y Royal Dawn compartieron temperaturas de fusión similares (~77.5 °C), aunque Royal Lee mostró una curva más estrecha y simétrica, lo que podría indicar mayor homogeneidad en su secuencia. En contraste, Regina y Kordia exhibieron temperaturas de fusión consistentemente más bajas (~77.0 °C), con formas de curva más amplias y asimétricas. Las T_m diferenciales se detallan en la Tabla 6. Estas diferencias térmicas sustentan la capacidad discriminativa del sistema HRM para distinguir entre las cuatro variedades analizadas, confirmando su aplicabilidad en estudios de genotipado varietal.

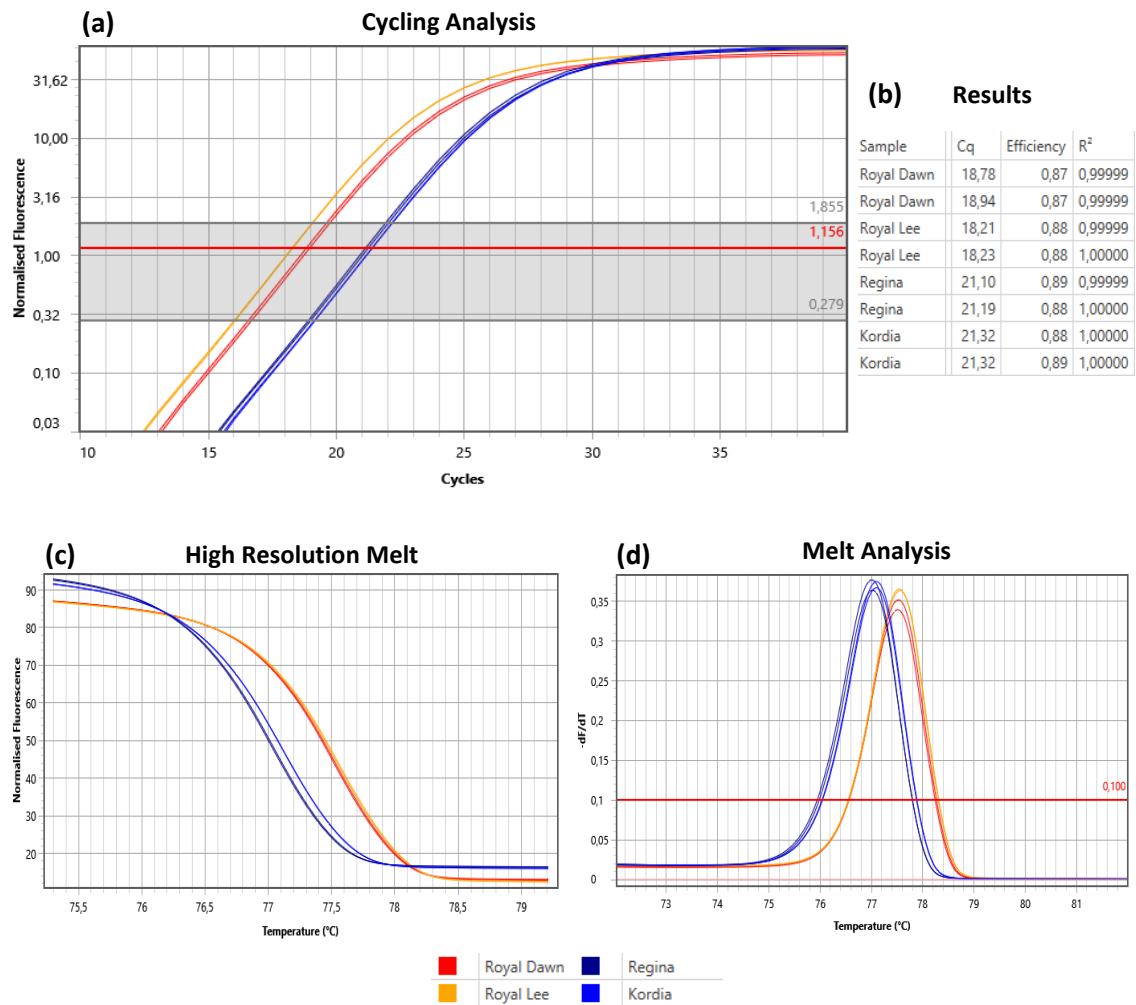


Figura 3.10 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN "A" para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TD2-TD1. (a) Curva de amplificación: Fluorescencia normalizada vs ciclos. Línea roja horizontal indica el threshold para determinación de Cq; (b) Resultados cuantitativos de la curva de amplificación; (c) Análisis de High Resolution Melting (HRM): Curvas de fusión normalizadas en rango estrecho (75-79°C); (d) Curva de Melt derivada (-dF/dT) mostrando picos de temperatura de fusión (T_m).

Tabla 3.6. T_m obtenidas a partir del HRM para el conjunto de partidores TD2-TD1 para las cuatro variedades analizadas, utilizando ADN "A".

Variedad	T _m (°C)
Royal Dawn	77.52

Royal Dawn	77.50
Royal Lee	77.55
Royal Lee	77.53
Regina	77.00
Regina	77.02
Kordia	77.09
Kordia	77.09

3.10. Extrapolación de resultados a variedades no analizadas in silico.

Con el objetivo de evaluar la capacidad predictiva de la región seleccionada más allá de las cuatro variedades analizadas in silico, se extendió el análisis a un conjunto de nuevas variedades de cerezo no incluidas previamente en el estudio bioinformático. A estas nuevas variedades se les aplicó el mismo protocolo experimental: se realizaron extracciones de ADN genómico seguidas de análisis por PCR convencional y qPCR-HRM utilizando los conjuntos de partidores previamente optimizados y validados. Esta aproximación permitió evaluar el comportamiento de la región amplificada en un contexto genético más amplio, con el fin de determinar la capacidad predictiva y discriminativa del sistema más allá del grupo de estudio original.

3.10.1. Extracción de ADN genómico.

Los resultados de la extracción de ADN mostraron diferencias en la calidad y cantidad del material genético obtenido entre las variedades analizadas, las cuales fueron Brooks, Cristobalina y Mini Royal, correspondientes a variedades tempranas, y Sweetheart, Staccato y Schneider, correspondiente a variedades tardías. En la primera extracción (Fig. 3.11a), las variedades tempranas Brooks y Cristobalina presentaron bandas tenues, lo que indicó una baja concentración del ADN, mientras que Mini Royal presentó bandas un poco más intensas y Sweetheart, exhibió bandas bien definidas, confirmando una extracción exitosa para estas. Para mejorar los resultados de las primeras dos, se repitió el proceso de extracción (Fig. 3.11b) y se le sumaron Staccato y Schneider. En esta segunda extracción, Brooks aumentó significativamente la intensidad de sus bandas y Cristobalina aumentó levemente. Staccato mostró una intensidad similar a Cristobalina mientras que Schneider presentó bandas ligeramente más intensas.

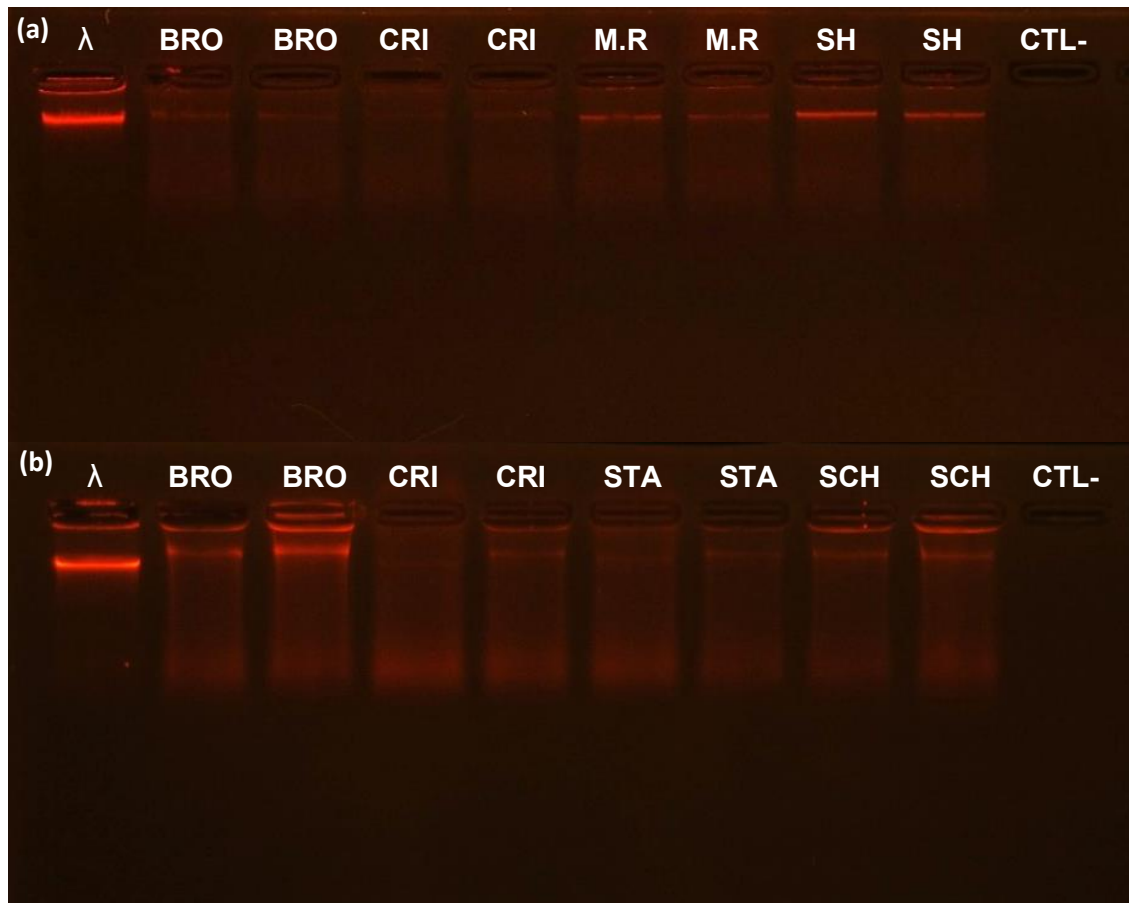


Figura 3.11 ADN genómico “C” de las seis variedades nuevas, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 75V por 45min. λ : ADN lambda; BRO: Brooks; CRI: Cristobalina; M.R: Mini Royal; SH: Sweetheart; STA: Staccato; SCH: Schneider; CTL-: control negativo.

3.10.2. Amplificación PCR y análisis qPCR-HRM.

Las variedades no consideradas en el análisis in silico fueron evaluadas mediante PCR convencional utilizando ambos conjuntos de partidores (TP2-TP1 y TD2-TD1) previamente validados. En el gel correspondiente al conjunto TP2-TP1 (Fig. 3.12a), se observaron los patrones esperados: dos bandas en Royal Dawn y

Royal Lee, correspondientes a la banda control y al SNP de interés, y una única banda en Regina y Kordia, lo cual concuerda con la presencia del SNP en variedades tempranas. En las variedades BRO, CRI, STA y SCH no se observó ninguna banda amplificada. En M.R. se observó solo la banda del SNP, sin presencia de banda control, mientras que SH presentó ambas bandas, resultado no esperado para una variedad tardía.

En el gel correspondiente al conjunto TD2-TD1 (Fig. 3.12b), se observó el patrón opuesto, coherente con la presencia del SNP en variedades tardías. En este caso, RD y RL presentaron únicamente la banda control, mientras que REG y KOR mostraron las dos bandas esperadas. Al igual que en el análisis anterior, BRO, CRI, STA y SCH no mostraron amplificación detectable. M.R. presentó únicamente la banda control, lo cual es consistente con su genotipo esperado, mientras que SH mostró también solo la banda control, en contradicción con su carácter de variedad tardía.

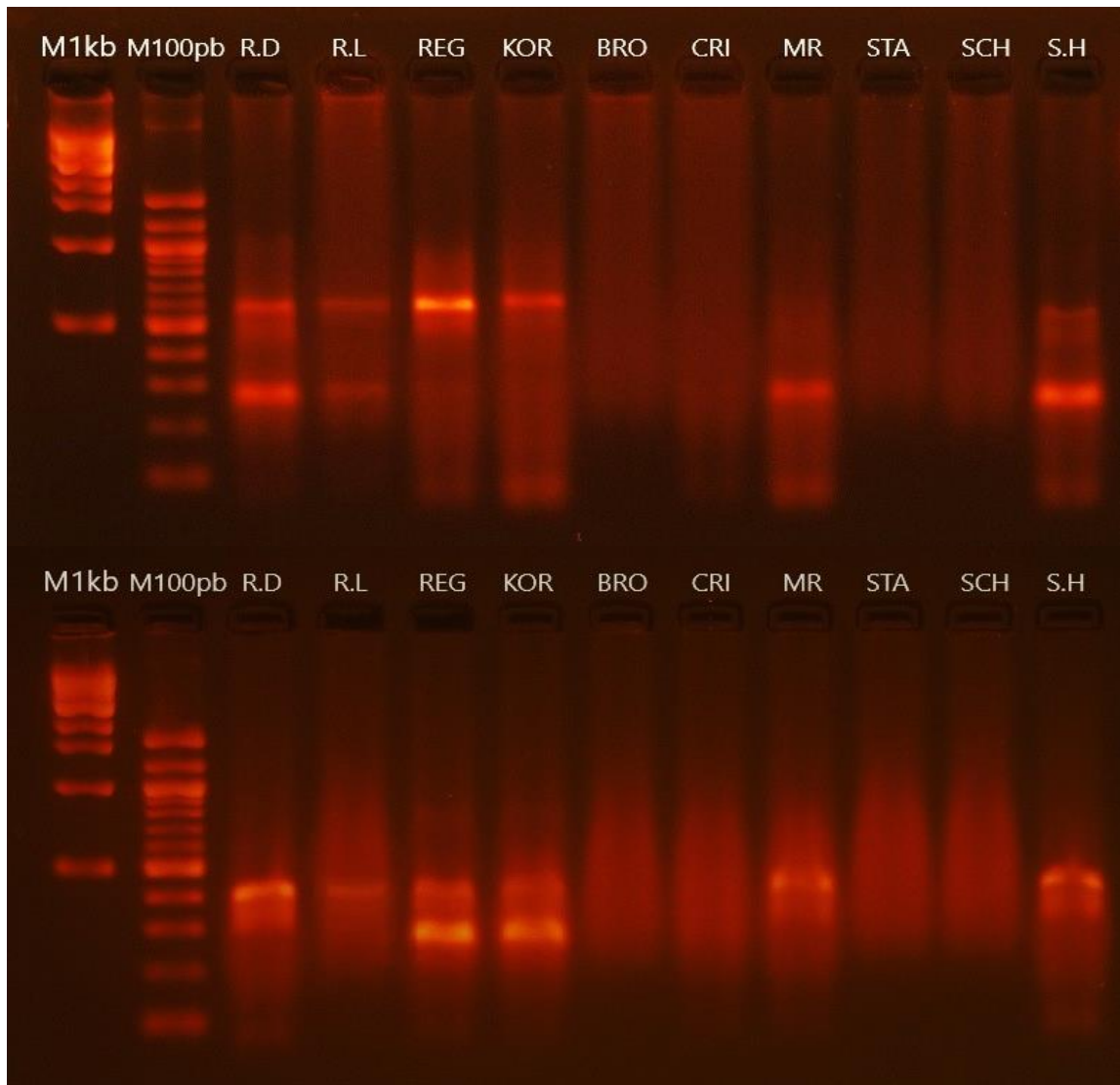


Figura 3.12 Amplificación mediante PCR convencional a partir de ADN “C” con los conjuntos de partidores TP2-TP1 (a) y TD2-TD1 (b) en variedades de cerezo no incluidas en el análisis *in silico*. R.D: Royal Dawn; R.L: Royal Lee; BRO: Brooks; CRI: Cristobalina; M.R: Mini Royal; STA: Staccato; SCH: Schneider; SH: Sweetheart.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante qPCR-HRM para el conjunto TP2-TP1 mostraron información relevante para las diez variedades analizadas. En el gráfico de amplificación (Fig. 3.13a), las curvas mostraron una fase

exponencial bien definida en todas las variedades, con pendientes consistentes y una transición suave a la meseta, lo que confirma la ausencia de inhibidores y la robustez de las reacciones. Los parámetros cuantitativos (Fig. 3.13b) respaldaron la calidad del análisis con eficiencias dentro del rango óptimo (87-88%) y valores de R^2 cercanos a 1.0. El análisis HRM (Fig. 3.13c) reveló patrones de fusión diferenciados en dos grupos principales. El primer grupo (R.D, R.L, BRO, M.R, STA y S.H) exhibió temperaturas de fusión (T_m) elevadas ($\sim 77.69-77.73^\circ\text{C}$), mientras que el segundo grupo (REG, KOR, CRI y SCH) mostró T_m más bajas ($\sim 77.20-77.40^\circ\text{C}$) (Tabla 7).

En el caso del conjunto de partidores TD2-TD1, en el gráfico de amplificación y tabla de resultados (Fig. 3.14a-b) se observó que la variedad Royal Lee, Brooks y Royal Dawn alcanzaron la fase exponencial más rápidamente ($C_q \sim 21-24$). Por el contrario, Cristobalina, Mini Royal y Staccato mostraron los valores de C_q más altos ($C_q \sim 26-27$), sugiriendo una menor abundancia inicial del ADN diana. El análisis de la curva de melt (Fig. 3.14d) reveló dos grupos principales según sus T_m al igual que para el conjunto TP2-TP1. El primer grupo, con las T_m más altas ($77.69-77.73^\circ\text{C}$), incluyó a Royal Dawn, Royal Lee, Brooks, Mini Royal, Staccato y Sweetheart, mientras que Regina, Kordia, Cristobalina y Schneider formaron un segundo grupo con las T_m más bajas ($77.20-77.40^\circ\text{C}$) (Tabla 8).

En el caso de ambos conjuntos (TP2-TP1 y TD2-TD1) y considerando el umbral previamente establecido de ± 0.2 °C como criterio de confianza, los resultados se traducen en una correcta diferenciación de las variedades Royal Dawn, Royal Lee, Regina, Kordia, Brooks, Mini Royal y Schneider; dejando fuera de los valores de Tm esperados a Cristobalina, Staccato y Sweetheart.

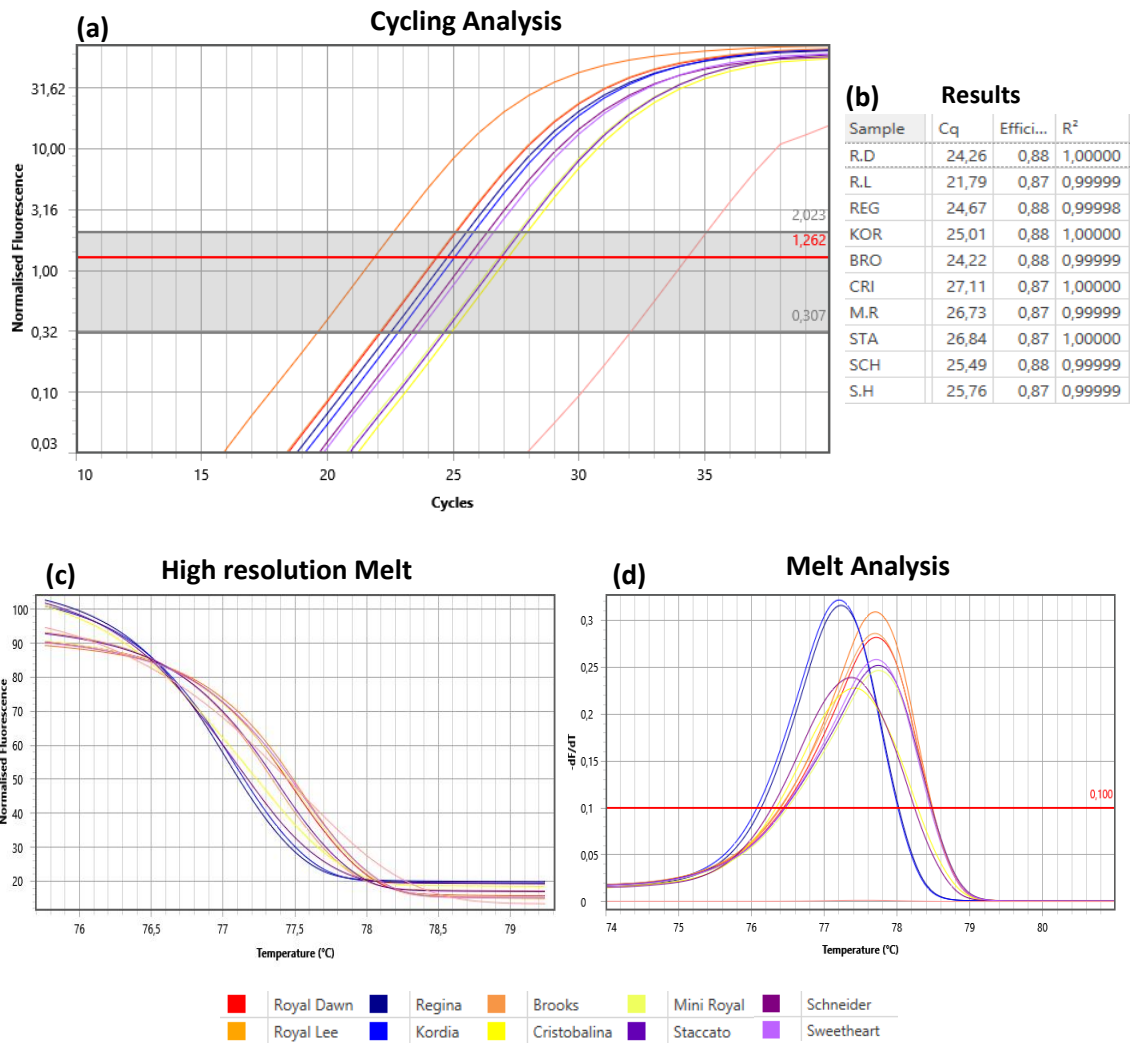


Figura 3.13 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN "C" para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TP2-TP1. (a) Curva de amplificación: Fluorescencia normalizada vs ciclos. Línea roja horizontal indica el threshold para determinación de Cq; (b) Resultados cuantitativos de la curva de amplificación; (c) Análisis de High Resolution Melting (HRM): Curvas de fusión normalizadas en rango estrecho (76-79°C); (d) Curva de Melt derivada (-dF/dT) mostrando picos de temperatura de fusión (T_m).

Tabla 3.7. T_m obtenidas a partir del HRM del conjunto de partidores TP2-TP1 para las diez variedades analizadas, utilizando ADN "C". En rojo se muestran aquellas T_m que salen de los valores esperados para su variedad.

Variedad	T _m (°C)

Royal Dawn	77,70
Royal Lee	77,69
Regina	77,22
Kordia	77,20
Brooks	77,69
Cristobalina	77,40
Mini Royal	77,73
Staccato	77,73
Schneider	77,36
Sweetheart	77,70

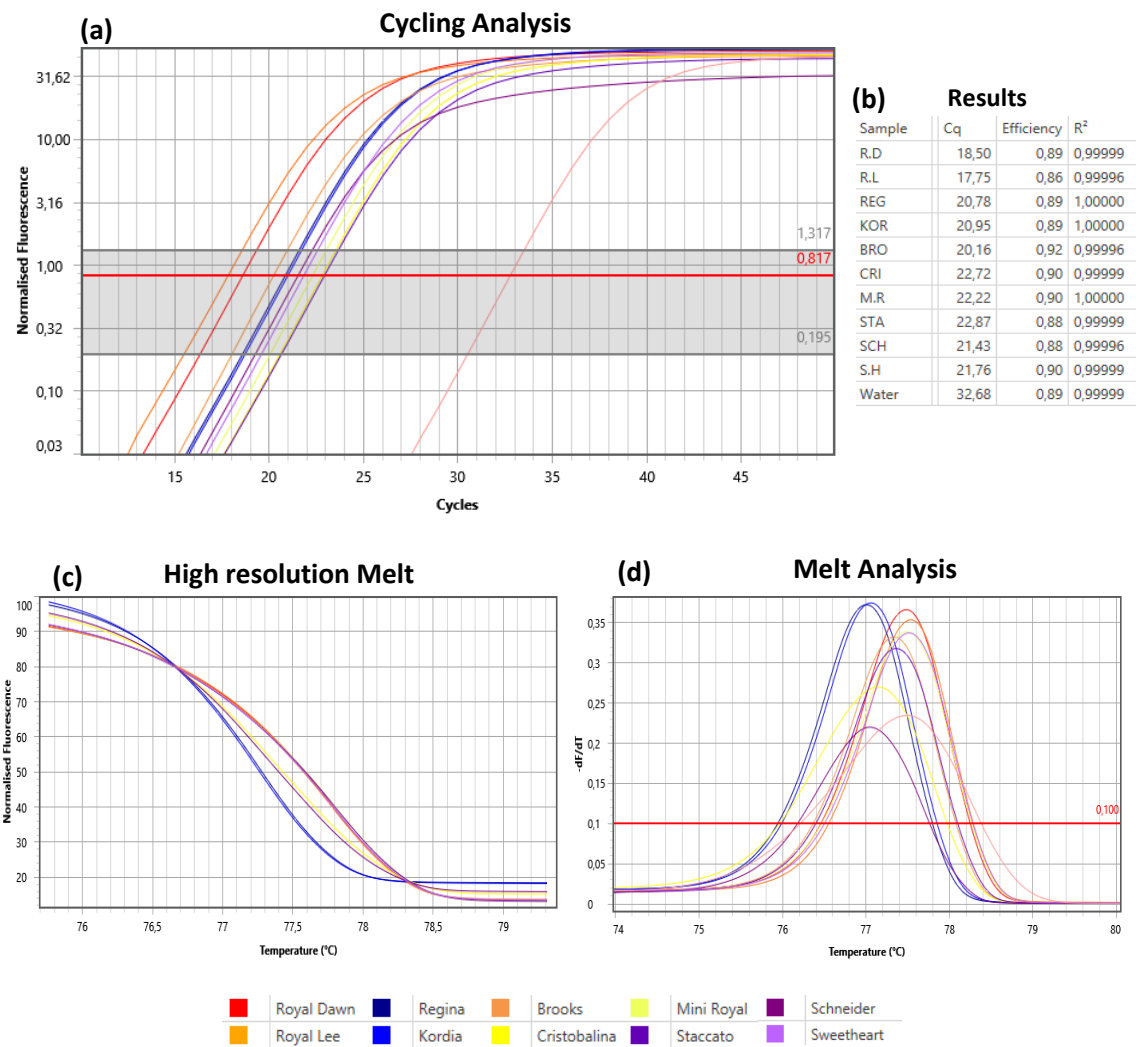


Figura 3.14 Análisis de qPCR-HRM a partir de ADN “C” para diferenciación de variedades usando conjunto de partidores TD2-TD1. (a) Curva de amplificación: Fluorescencia normalizada vs ciclos. Línea roja horizontal indica el threshold para determinación de Cq; (b) Resultados cuantitativos de la curva de amplificación; (c) Análisis de High Resolution Melting (HRM): Curvas de fusión normalizadas en rango estrecho (76-79°C); (d) Curva de Melt derivada (-dF/dT) mostrando picos de temperatura de fusión (T_m).

Tabla 3.8. T_m obtenidas a partir del HRM del conjunto de partidores TD2-TD1 para las diez variedades analizadas, utilizando ADN “C”. En rojo se muestran aquellas T_m que salen de los valores esperados para su variedad.

Variedad	T _m (°C)

Royal Dawn	77,47
Royal Lee	77,53
Regina	77,00
Kordia	77,05
Brooks	77,33
Cristobalina	77,13
Mini Royal	77,49
Staccato	77,36
Schneider	77,05
Sweetheart	77,51

IV. DISCUSIÓN

4.1. Validación de SNPs como herramienta discriminatoria.

Uno de los principales objetivos de esta investigación es determinar si polimorfismos de nucleótido único (SNPs) identificados mediante secuenciación de tercera generación pueden emplearse como marcadores moleculares para discriminar variedades de cerezo dulce (*Prunus avium*) con distinto nivel de precocidad. Los resultados respaldan esta hipótesis, evidenciando una diferenciación consistente entre variedades tempranas y tardías tanto por PCR convencional como mediante High Resolution Melting (HRM).

La selección de variantes con potencial discriminatorio se fundamenta en datos de secuenciación de tercera generación obtenidos con tecnología Oxford Nanopore, capaz de caracterizar SNPs con alta resolución, incluso en genomas complejos (Bello Ribeiro, 2016; Logsdon et al., 2020). Esta plataforma permite identificar SNPs localizados dentro de regiones continuas que se expresan de forma consistente entre variedades, lo que incrementa la probabilidad de que formen parte de bloques heredados o haplotipos asociados a rasgos fenotípicos. De las tres regiones candidatas detectadas, se selecciona aquella con múltiples SNPs presentes en variedades tardías y ausentes en tempranas, evitando zonas con alto contenido de GC, polimorfismos no deseados o espacios sin cobertura

que pudieran comprometer la fiabilidad del marcador. Este enfoque es coherente con estudios como el de Kishor et al. (2021) en pepino, donde SNPs en regiones conservadas permitieron discriminar rasgos comerciales como el color de piel.

El análisis bioinformático indica que la región seleccionada codifica una proteína ortóloga a la isopenteniltransferasa (IPT) en *Prunus persica*, enzima clave en la biosíntesis de citoquininas. Estas hormonas participan en procesos como la división celular y la maduración de frutos ((Matsuo et al., 2012; Mujica et al., 2020; Sutton, 2019), y su modulación puede alterar el tiempo de maduración. La ruta “Zeatin biosynthesis” (KEGG pper00908) en la que interviene la IPT ha sido vinculada a la regulación temporal de la maduración en durazno, donde niveles endógenos elevados en etapas tempranas y la aplicación exógena en fases tardías pueden retrasar la maduración. Por tanto, es plausible que los SNPs detectados modifiquen la actividad enzimática o el patrón de producción de citoquininas, contribuyendo a las diferencias observadas entre variedades de distinta precocidad.

El diseño de partidores para detectar estos SNPs se realiza mediante la metodología Temperature Switch PCR (TSP) (Tabone et al., 2009), que combina partidores con distinta T_m para permitir una amplificación inicial de la región diana y una posterior discriminación alélica. Los partidores forward cortos (FC) se diseñan con los SNPs clave posicionados en el extremo 3', lo que incrementa la

especificidad en PCR alelo-específica (Liu et al., 2012). Aunque el diseño estándar incluye cuatro partidores (FL, RL, FC y RC), la eliminación del RL reduce productos inespecíficos y la formación de dímeros, manteniendo la discriminación, de forma similar a lo observado en optimizaciones de PCR multiplex (Xie et al., 2022).

Las configuraciones finales optimizadas (TP2-TP1, TD1 y TD2-TD1; Tabla 3) generan, en PCR convencional, patrones de bandas específicos y reproducibles que diferencian con alta precisión variedades tempranas y tardías, en concordancia con estudios que validan electroforesis en gel como herramienta de identificación varietal (Muñoz-Espinoza et al., 2017; Abdel-Hameed et al., 2020). Previo a la validación por HRM, se evalúa la influencia del método de extracción y la dilución del ADN, observándose que las variaciones en la temperatura de melting (T_m) se mantienen dentro del umbral técnico de $\pm 0,2$ °C propuesto por Liew et al. (2004), lo que confirma que las diferencias observadas entre variedades no se deben a variaciones técnicas. Este umbral se adopta como criterio de confianza para la clasificación. El método de extracción A muestra mayor consistencia que el B, posiblemente por una menor coextracción de polisacáridos o polifenoles, compuestos que inhiben la PCR (Marsal et al., 2013).

En qPCR-HRM, los conjuntos TP2-TP1 y TD2-TD1 producen perfiles de fusión robustos, con diferencias de T_m de aproximadamente 0,5 °C entre variedades tempranas y tardías (Tablas 5 y 6), margen suficiente para una clasificación fiable (Wittwer, 2009; Simko, 2016). La combinación FL↔RC se selecciona estratégicamente por abarcar regiones con múltiples SNPs sin exceder los 400 pb, rango óptimo para HRM, dado que amplicones más largos reducen la sensibilidad (Simko, 2016). La reproducibilidad técnica es elevada ($\Delta T_m < 0,02$ °C entre réplicas), lo que refuerza la fiabilidad del sistema.

Estos resultados concuerdan con trabajos que validan HRM para la diferenciación genética. En *Prunus avium*, Muñoz-Espinoza et al. (2017) emplean HRM para identificar haplotipos S40 asociados a autocompatibilidad, mientras que Chen et al. (2022) demuestran su utilidad para autenticar *Dendrobium officinale* y Liew et al. (2004) confirman que incluso diferencias de T_m de 0,2 °C permiten discriminar genotipos en SNPs humanos. En conjunto, la metodología aplicada en este estudio presenta una resolución suficiente y estable para diferenciar genotipos estrechamente relacionados y con posible relevancia funcional en la regulación de la precocidad del cerezo dulce.

4.2. Consistencia en variedades no incluidas in silico.

Con el fin de evaluar la aplicabilidad del marcador más allá de las variedades analizadas in silico (Royal Dawn, Royal Lee, Regina y Kordia), el análisis se extiende seis cultivares adicionales de *Prunus avium*: Brooks, Mini Royal y Cristobalina (tempranas), junto con Sweetheart, Staccato y Schneider (tardías). El objetivo es determinar si el patrón de discriminación observado en las variedades de referencia se mantiene en un espectro genético más amplio, validando así el marcador como herramienta predictiva. El ADN se extrae a partir de tejido foliar siguiendo el protocolo optimizado para las muestras tipo A. Debido al transporte interregional del material, se observa oxidación foliar en algunas muestras, lo que puede haber comprometido parcialmente la integridad del ADN. Aun así, las concentraciones y pureza obtenidas fueron suficientes para ejecutar los ensayos de PCR convencional y qPCR-HRM.

En PCR convencional, los resultados son heterogéneos. Mini Royal presenta un patrón de bandas congruente con su clasificación como variedad temprana en ambos conjuntos de partidores (TP2-TP1 y TD2-TD1). Cuatro variedades no muestran amplificación detectable, lo que sugiere la presencia de polimorfismos adicionales en las regiones de anclaje de los partidores que impiden la hibridación eficiente, fenómeno ampliamente documentado en PCR alelo-específica (Graham et al., 2005). Un caso particular es Sweetheart, que muestra el patrón esperado para variedades tempranas a pesar de su clasificación como tardía, indicando un posible haplotipo alternativo o una recombinación en la región

evaluada. Casos similares se han descrito en vid, donde la presencia de variantes no contempladas en el diseño de marcadores produjo genotipados discordantes con la clasificación fenotípica (Abdel-Hameed et al., 2020).

El análisis por qPCR-HRM resulta más informativo. En conjunto, siete de las diez variedades analizadas presentaron temperaturas de melting (T_m) congruentes con su grupo de precocidad esperado. Sin embargo, Cristobalina, Staccato y Sweetheart mostraron T_m propias de variedades tempranas pese a su clasificación como tardías. El control de calidad del análisis descarta que estas desviaciones se deban a variaciones técnicas, ya que las diferencias observadas superan el umbral técnico aceptable de $\pm 0,2$ °C (Liew et al., 2004), confirmando que son atribuibles a factores genéticos y no a ruido experimental.

Un aspecto relevante es que estas tres variedades con comportamiento atípico comparten la característica de autocompatibilidad, rasgo poco frecuente en *P. avium*. Esta coincidencia sugiere que el locus IPT-like analizado podría estar implicado no solo en la precocidad, sino también en procesos reproductivos. La literatura respalda esta posibilidad, en estudios en petunia y tomate, niveles elevados de citoquininas, hormonas cuya síntesis depende de IPT, se han vinculado a la detención del crecimiento del tubo polínico en sistemas autoincompatibles (Zakharova et al., 2023). Es plausible que variantes regulatorias o estructurales en esta región hayan contribuido a la transición hacia

la autocompatibilidad, afectando simultáneamente patrones de maduración. Estudios en otros frutales también han documentado casos donde un marcador diseñado para un rasgo agronómico presenta asociación indirecta con caracteres reproductivos. En durazno, Mujica et al. (2020) demuestran que genes reguladores de citoquininas, inicialmente estudiados por su efecto en maduración, también influyen en la viabilidad polínica y el cuajado. De forma similar, en manzano, Wang et al. (2023) identifican que haplotipos asociados a firmeza postcosecha coinciden con variaciones en genes implicados en auto-incompatibilidad. Esta observación, si bien preliminar, refuerza la idea de que la región estudiada podría tener funciones pleiotrópicas, actuando tanto en la regulación de la maduración como en la reproducción.

Si los SNPs identificados se localizan dentro de intrones, como ocurre frecuentemente en genes reguladores, es posible que actúen como elementos de control de *splicing* alternativo o como secuencias moduladoras de la expresión génica, lo que explicaría el comportamiento diferencial observado. Para validar esta hipótesis se requiere una caracterización más profunda de la región, incluyendo la secuenciación completa del gen en estas variedades, así como análisis de expresión génica y cuantificación hormonal. Tales estudios permitirían determinar si existe una relación funcional entre la región genómica analizada, la autocompatibilidad y la precocidad, o si las diferencias observadas responden a mecanismos independientes pero colocalizados. En cualquier caso, los

resultados obtenidos en esta etapa de validación externa destacan la importancia de considerar el contexto genético y fisiológico de cada cultivar al momento de aplicar herramientas moleculares para la identificación varietal y la selección asistida por marcadores (Wünsch, A., 2003).

4.3. Impacto del método de extracción de ADN en la estabilidad de los resultados.

La calidad del ADN utilizado en qPCR-HRM influye directamente en la reproducibilidad y confiabilidad de los perfiles de fusión. Por este motivo, se evalúa el efecto del método de extracción y de la concentración del ADN sobre la estabilidad de las temperaturas de melting (T_m), a fin de determinar si estas variables pueden introducir sesgos en la interpretación de diferencias genéticas entre variedades.

Se comparan dos métodos de extracción (A y B) y tres diluciones (1:1, 1:10 y 1:100), observándose que las variaciones de T_m entre métodos y diluciones se mantienen dentro del umbral técnico de $\pm 0,2$ °C definido por Liew et al. (2004) como límite de variabilidad aceptable en ensayos de alta sensibilidad. Este comportamiento indica que el sistema presenta robustez frente a cambios moderados en la calidad y concentración del ADN.

No obstante, se detecta una mayor variabilidad en la variedad Regina cuando se utiliza ADN extraído con el método B. Este patrón sugiere la posible presencia de inhibidores residuales como polisacáridos o polifenoles, compuestos comunes en tejidos vegetales leñosos y frutos que interfieren con la actividad de la ADN polimerasa (Marsal et al., 2013). Dichos contaminantes pueden afectar la eficiencia de amplificación y modificar la estabilidad térmica del amplicón, alterando así la T_m registrada. El mejor desempeño del método A podría atribuirse a una mayor eficiencia en la eliminación de estos compuestos, proporcionando un ADN más puro y con resultados más consistentes.

En HRM, la influencia de la concentración del ADN sobre la T_m suele ser limitada, ya que la amplificación hasta la fase plateau tiende a homogeneizar diferencias iniciales de concentración (Liew et al., 2004). Sin embargo, la reproducibilidad mejora cuando las muestras se cuantifican y ajustan a una concentración uniforme, minimizando el ruido técnico (Simko, 2016). Por este motivo, en los análisis posteriores se emplea ADN sin diluciones innecesarias, priorizando la concentración óptima determinada experimentalmente.

Estos resultados confirman que, aunque la técnica tolera variaciones moderadas en pureza y concentración, la calidad del ADN sigue siendo un factor crítico para maximizar la resolución en qPCR-HRM. En un contexto de aplicación práctica, la estandarización del método de extracción y el control de calidad del ADN previo

al análisis constituyen pasos esenciales para garantizar la fiabilidad del diagnóstico molecular.

4.4. Limitaciones y consideraciones para aplicaciones futuras.

Los resultados indican que el marcador presenta alta capacidad discriminativa en las variedades de referencia, pero su aplicabilidad podría estar restringida a un subconjunto genético específico. La presencia de perfiles moleculares atípicos en algunas variedades sugiere que el locus IPT-like podría no ser universalmente predictivo de la precocidad en *Prunus avium*.

Para confirmar su alcance real, es necesario ampliar la validación a una colección más diversa de variedades, incorporando diferentes orígenes genéticos y antecedentes parentales. Esta validación debe incluir pruebas en condiciones ambientales contrastantes para determinar la robustez del marcador frente a variabilidad climática y de manejo. Asimismo, futuros trabajos deberían contemplar un mayor número de replicaciones técnicas para reforzar la consistencia estadística de los resultados y evaluar otros posibles polimorfismos que complementen la identificación varietal, ya que el uso de múltiples marcadores incrementa la capacidad de discriminación y reduce falsos negativos en genotipado (Wittwer, 2009; Simko, 2016).

En caso de implementarse en contextos productivos, la metodología requerirá protocolos estandarizados para extracción de ADN, control de calidad de muestras y análisis de datos. Además, se sugiere establecer un umbral conservador para diferenciar variaciones técnicas atribuibles al método de extracción o a la calidad del ADN, considerando que contaminantes como polifenoles y polisacáridos pueden interferir con la actividad de la polimerasa y alterar las temperaturas de melting (Marsal et al., 2013), y que diferencias técnicas inferiores a $\pm 0,2$ °C en HRM pueden considerarse ruido experimental (Liew et al., 2004).

Desde una perspectiva de investigación aplicada, es fundamental garantizar la reproducibilidad interlaboratorio, evaluando el desempeño del marcador en centros con equipamiento y operadores distintos para validar su transferibilidad. Asimismo, se recomienda integrar este marcador con análisis genómicos de mayor resolución, como genotyping-by-sequencing (GBS) o secuenciación dirigida (targeted resequencing), los cuales permiten confirmar SNPs, detectar polimorfismos adicionales y caracterizar completamente regiones genómicas de interés (Logsdon et al., 2020; Porubsky & Eichler, 2024). De forma complementaria, se recomienda realizar estudios funcionales adicionales para validar el efecto causal del SNP, incluyendo ensayos de expresión génica, cuantificación de citoquinas y edición génica dirigida (por ejemplo, CRISPR/Cas9). La caracterización más profunda del gen homólogo a IPT3

permitiría dilucidar su rol en la regulación de la precocidad y en la interacción con otras rutas hormonales, aportando evidencia directa sobre su participación en el fenotipo.

Para su integración en programas de mejoramiento y certificación varietal, este marcador debería implementarse junto con datos fenotípicos de referencia, permitiendo calibrar y ajustar la interpretación de los perfiles moleculares. La combinación de una validación genética más amplia, la incorporación de marcadores complementarios y el establecimiento de estándares operativos permitirá determinar con precisión el valor del marcador como herramienta de selección asistida por marcadores (MAS) y su potencial integración en estrategias de identificación varietal a nivel comercial (Zakharova et al., 2023; Mujica et al., 2020; Wang et al., 2023).

V. CONCLUSIONES

La validación de los conjuntos de partidores TP2-TP1 y TD2-TD1, diseñados a partir de un SNP identificado en datos de secuenciación de tercera generación y optimizados mediante la metodología Temperature Switch PCR (TSP), demostró una alta eficacia para discriminar variedades de cerezo dulce (*Prunus avium*) con precocidad contrastante. Mediante PCR convencional se obtuvieron patrones de amplificación específicos y reproducibles, mientras que el análisis por qPCR-HRM permitió diferenciar consistentemente variedades tempranas (Royal Dawn, Royal Lee) y tardías (Regina, Kordia) a partir de temperaturas de fusión características.

La aplicación del protocolo a un grupo ampliado de variedades no incluidas en el análisis *in silico* confirmó su versatilidad para la identificación varietal temprana, logrando clasificar correctamente la mayoría de los genotipos. Sin embargo, en variedades autocompatibles como Sweetheart, Staccato y Cristobalina se detectaron discrepancias en los perfiles de amplificación y temperaturas de fusión esperadas. Estas diferencias podrían deberse a la presencia de polimorfismos adicionales en las regiones de anclaje de los partidores o a una posible interacción genética entre los mecanismos de autocompatibilidad y la precocidad, lo que abre una línea de investigación complementaria. Asimismo, factores técnicos como la calidad variable del ADN extraído de tejido foliar, posiblemente

afectada por oxidación durante el transporte, también pudieron influir en la resolución de los análisis de qPCR-HRM.

El conjunto de SNPs validados se localiza en un gen ortólogo a la isopenteniltransferasa (IPT), implicado en la biosíntesis de citoquininas, hormonas asociadas al desarrollo y maduración de frutos. Su potencial como marcador molecular en etapas tempranas del ciclo de cultivo es significativo, pues puede contribuir a optimizar la planificación productiva, reducir los tiempos de selección en programas de mejoramiento genético y reforzar las estrategias de manejo varietal en la industria cerecera. La validación en un espectro más amplio de germoplasma y la caracterización funcional del gen IPT-like, junto con estudios de expresión y cuantificación de citoquininas, permitirán consolidar su aplicación como herramienta de diagnóstico temprano y selección asistida por marcadores (MAS) en *Prunus avium*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abdel Hameed, U. K., Abdelaziz, K., & Sherif, N. E. (2020). Genetic diversity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars in Al-Madinah Al-Munawara based on molecular markers and morphological traits. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 27(1), 113–127. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v27i1.47573>
- 2) Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- 3) Barros, F., Rodríguez, J., & Ivelic, M. (2020). Postcosecha de nuestras principales variedades de cerezas. Smartcherry. <https://smartcherry.cl/postcosecha/postcosecha-de-nuestras-principales-variedades-de-cerezas/>
- 4) Bello Ribeiro, A. C. (2016). A quantitative exploration of causes of false positive single nucleotide polymorphisms in next-generation sequencing data [Tesis doctoral, University of Dundee]. <https://discovery.dundee.ac.uk/en/studentTheses/a-quantitative-exploration-of-causes-of-false-positive-single-nuc>
- 5) Campos de Q., Hugo, Salvo G., Haroldo (1995). Marcadores moleculares: aplicaciones al mejoramiento genético de plantas [en línea]. *Agro Sur*. v. 23(2) p. 173-185. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/38497>
- 6) Cerezos – Viveros Copequen. (2021). Viveros Copequen – Chile. <http://viveroscopequen.cl/cerezos/>
- 7) Chen, W., Chen, X., Xu, J., Cai, J., & Wang, X. (2022). Identification of dendrobium officinale using DNA barcoding method combined with HRM and qpcr technology. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02194-y>

- 8) Ellena D., Miguel. (2012). Formación y sistemas de conducción del cerezo dulce. Temuco: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 247. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7500>
- 9) Gill–Langarica, H. R., & Mayek–Pérez, N. (2008). Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y perspectivas. Revista mexicana de fitopatología, 26(2), 164–172. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200009
- 10) Graham, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E., & Wittwer, C. T. (2005). Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. Clinical Chemistry, 51(7), 1295–1298. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051516>
- 11) Guo, J., Cao, K., Deng, C., Li, Y., Zhu, G., Fang, W., Chen, C., Wang, X., Wu, J., Guan, L., Wu, S., Guo, W., Yao, J.-L., Fei, Z., & Wang, L. (2020). An integrated peach genome structural variation map uncovers genes associated with fruit traits. Genome Biology, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02169-y>
- 12) Johnson, A. D. (2009). Single-Nucleotide Polymorphism Bioinformatics. Circulation: Cardiovascular Genetics, 2(5), 530–536. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.109.872010>
- 13) Kishor, D. S., Alavilli, H., Lee, S.-C., Kim, J.-G., & Song, K. (2021). Development of SNP Markers for White Immature Fruit Skin Color in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Using QTL-seq and Marker Analyses. Plants, 10(11), 2341. <https://doi.org/10.3390/plants10112341>
- 14) Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution

melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50(7), 1156–1164. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>

- 15) Logsdon, G. A., Vollger, M. R., & Eichler, E. E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 597–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0236-x>
- 16) Marsal, G., Boronat, N., Canals, J. M., Zamora, F., & Fort, F. (2013). Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *vitis vinifera* L. *OENO One*, 47(4), 227. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2013.47.4.1559>
- 17) Masman, W. (2022). Manejos y novedades varietales en cerezos. *Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca*, 22(126), 9. <https://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2023/04/126.-Manejos-y-novedades-varietales-en-cerezos.-Dic.-2022.pdf>
- 18) Matsuo, S., Kikuchi, K., Fukuda, M., Honda, I., & Imanishi, S. (2012). Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5569–5579. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers207>
- 19) Mondini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19–35. <https://doi.org/10.3390/d1010019>
- 20) Montt, M., Urdinez, F., Aguirre, I., & Matamala, G. (2024). El auge de las cerezas chilenas y el desafío del mercado chino. *ICLAC*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10955906>
- 21) Mujica, K., Ponce, C., Silva, H., & Meisel, L. A. (2020). Identification of a conserved set of cytokinin-responsive genes expressed in the fruits of *Prunus persica*. *Plant Growth Regulation*, 92(1), 65–80. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00620-5>
- 22) Muñoz-Espinoza, C., Espinosa, E., Bascuñán, R., Tapia, S., Meneses, C., & Almeida, A. M. (2017). Development of a molecular marker for self-

- compatible S4' haplotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using high-resolution melting. *Plant Breeding*, 136(6), 987–993. <https://doi.org/10.1111/pbr.12546>
- 23) Porubsky, D., & Eichler, E. E. (2024). A 25-year odyssey of genomic technology advances and structural variant discovery. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.002>
- 24) Quiroz, I., Miranda, C., Mühlenbrock, N., Urrutia, I., Alfaro, D., & Quiroz, R. (2023). Anuarios de mercado 2023: Cerezas mercado internacional. iQonsulting. https://www.iqonsulting.com/files/230412-Anuario_cerezas_2023.pdf
- 25) Rodrigues, L. (2003). Caracterización morfológica, isoenzimática y molecular de variedades de cerezo (*Prunus avium* L.) y de guindo (*Prunus cerasus* L.) portuguesas [Doctoral thesis, UPM]. Biblioteca Digital do IPB. <http://hdl.handle.net/10198/6007>
- 26) Simko, I. (2016). High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research. *Trends in Plant Science*, 21(6), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>
- 27) Sutton, M. K. (2019). Fruit load reduction in *prunus persica* (l.): The effects of timing and intensity and the role of cytokinins [Tesis de magister, University of Georgia]. <https://openscholar.uga.edu/record/5491?v=pdf>
- 28) Tabone, T., Mather, D. E., & Hayden, M. J. (2009). Temperature Switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs. *BMC Genomics*, 10(1), 580. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-580>
- 29) Voss-Fels, K., & Snowdon, R. J. (2015). Understanding and utilizing crop genome diversity via high-resolution genotyping. *Plant Biotechnology Journal*, 14(4), 1086–1094. <https://doi.org/10.1111/pbi.12456>

- 30) Wang, T., Duan, S., Xu, C., Wang, Y., Zhang, X., Xu, X., Chen, L., Han, Z., & Wu, T. (2023). Pan-genome analysis of 13 *Malus* accessions reveals structural and sequence variations associated with fruit traits. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43270-7>
- 31) Wittwer, C. T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 30(6), 857–859. <https://doi.org/10.1002/humu.20951>
- 32) Wünsch, A. (2003). Caracterización molecular en cerezo (*Prunus avium L.*): Identificación varietal, relaciones de similitud e incompatibilidad polen-pistilo [Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra. Departamento de Producción Agraria]. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. <http://hdl.handle.net/10532/1096>
- 33) Xie, N.G., Wang, M.X., Song, P. et al. (2022). Designing highly multiplex PCR primer sets with Simulated Annealing Design using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE). *Nat Commun* 13, 1881. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29500-4>
- 34) Zakharova, E., Khanina, T., Knyazev, A., Milyukova, N., & Kovaleva, L. V. (2023). Hormonal Signaling during dPCD: Cytokinin as the Determinant of RNase-Based Self-Incompatibility in Solanaceae. *Biomolecules*, 13(7), 1033. <https://doi.org/10.3390/biom13071033>