



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**VALIDACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES MEDIANTE ANÁLISIS
DE FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM) PARA LA CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE *Pitavia punctata* (Ruiz & Pav.) Mol.**

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

POR: Eduardo Alberto Muñoz Gómez

Profesor Guía: Rodrigo Jorge Hasbún Zaror

Marzo, 2026

Concepción, Chile

© 2026, Eduardo Alberto Muñoz Gómez

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

VALIDACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES MEDIANTE ANÁLISIS
DE FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM) PARA LA CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE *Pitavia punctata* (Ruiz & Pav.) Mol.

Profesor Guía



Rodrigo Jorge Hasbún Zaror

Profesor Titular

Ingeniero Forestal, PhD

Profesora Guía



Lubia María Guedes García

Colaboradora externa

Licenciada en Biología, Dra.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi hija Inara, por ser mi brújula y motor de vida. Fuiste la gran motivación para enfrentar este desafío, ya que tus primeros pasos me devolvieron el asombro por la naturaleza, por las plantas, los hongos y por cada ser vivo que se cruzaba en tu camino. La idea de comprender la naturaleza y el ecosistema del cual inexorablemente somos parte nació junto a tu llegada a este mundo. Sé que el tiempo no corre sin pasar factura, pero este es el fruto de años de sacrificio que espero puedan compensar de alguna manera mi ausencia en tu diario vivir. Te lo dedico de todo corazón y agradezco que seas parte de mi vida.

También quiero dedicar esta memoria de título a mi familia, a mi madre Gloria, quien a pesar de todos los altos y bajos de la vida, siempre me ha brindado su apoyo incondicional, quien me dio la vida y la fortaleza para enfrentar las adversidades con sabiduría y coraje, mi admiración para ti. A mis hermanos Claudia y Cristian, por haber sido parte de mi desarrollo como persona. A todos, gracias por existir y por haber apoyado de una u otra forma esta etapa de mi vida.

Finalmente dedico esta memoria a todas y todos los actores que generan un cambio de conciencia y paradigma universal, que ante las adversidades no claudican ni se dejan subyugar, que hacen de su vida una lucha constante y sin pausa, donde el miedo se transforma en fortaleza, sabiduría, coraje y superación.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincera gratitud a mis profesores guías, al profesor Rodrigo Hasbún, por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Epigenética Vegetal (LEV), por su paciencia, dedicación y compromiso en la investigación y docencia, y por haber sido un pilar fundamental en esta investigación, compartiendo su conocimiento, discusión y visión crítica, fomentando el aprendizaje continuo. Agradezco también a la profesora Lúbia Guedes, por brindarme su apoyo incondicional, compartiendo sus conocimientos y fomentando el trabajo colaborativo entre sus estudiantes, creando un ambiente colaborativo, interdisciplinario y científicamente riguroso. Si bien no fue posible incorporar en este documento todo el trabajo realizado con ella, agradezco la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Semioquímica Aplicada (LSqA) y fortalecer mis competencias profesionales como Ingeniero en Biotecnología. A ambos, muchas gracias por contribuir con este proceso y por fortalecer la resiliencia en los procesos más difíciles.

Agradezco al proyecto FIBN CONAF 005/2022 liderado por el Dr. Diego Muñoz Concha, Universidad Católica del Maule, por permitirme colaborar en uno de sus objetivos y brindar el financiamiento necesario para llevar a cabo esta investigación y por permitirme conocer *in situ* el hábitat del Pitao, experiencia que fortaleció mi espíritu conservacionista.

En segundo lugar, pero no menos importante, agradezco a todas las personas que me acompañaron en estos años de intenso y gratificante aprendizaje. Sé que es difícil dejar constancia de todas las personas que me apoyaron en este duro proceso y sé también que las palabras de gratitud no son suficientes para expresar todo mi agradecimiento. Sin embargo, sepan que cada uno de ustedes se encuentra inmerso en esta profunda gratitud. Y si bien no los puedo mencionar a todos, corresponde nombrar a quienes estuvieron en todo momento apoyándome. A Javiera, por ser desde hace muchos años una compañera de ideas y de sueños, a quien vi crecer como socióloga y quien me brindó un hogar en los primeros años de estudio; Alin por ser mi gran apoyo en estos últimos cuatro años como compañera de vida y quien me ha sostenido en los momentos más álgidos y duros de esta etapa, agradezco tu compañía, tu amor y el amor por la naturaleza y por supuesto por la complicidad de vivir en un mundo mejor. Agradezco a mis compañeros de carrera y de laboratorio quienes hicieron estos años difíciles, momentos memorables, largas jornadas de estudio, trabajo y excelentes momentos de recreación. Especialmente quiero agradecer a Florencia Quiroz, a quien reconozco como una excelente científica, capaz de conquistar todo lo que se proponga y a Mauricio Aguirre, un gran compañero y hombre de ciencia, ambos son inspiración como agentes de cambio en la ciencia, gracias por estar siempre presentes, por sus conocimientos compartidos, consejos y apoyo incondicional. A todos les deseo salud y bienestar. Mi más sincera gratitud para todos ustedes.

Índice de contenido

RESUMEN	xv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	2
II. METODOLOGÍA.....	7
2.1. Sitio de estudio y área de muestreo	7
2.2. Recolección del material vegetal	9
2.3. Establecimiento de jardín común.....	12
2.4. Extracción de ADN genómico de <i>P. punctata</i>	12
2.5. Selección de marcadores SSRs a partir de una base preexistente	13
2.6. Validación de marcadores microsatélites (SSRs) mediante PCR en tiempo real (qPCR) y análisis de fusión de alta resolución (HRM)	14
2.6.1. Protocolo para qPCR y HRM.	14
2.6.2. Criterios de selección de marcadores SSRs para análisis HRM... ..	15
2.6.3. Análisis de los perfiles de fusión y asignación de genotipos putativos mediante el análisis de fusión de alta resolución (HRM).....	16
2.6.4. Secuenciación Sanger de productos PCR	18
2.7. Caracterización preliminar de variabilidad genética.....	19
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1. Establecimiento de plántulas de <i>P. punctata</i> en condiciones de vivero.....	20
3.2. Extracción de ADN genómico de <i>P. punctata</i>	22
3.3. Detección y diseño de partidores microsatélites para <i>P. punctata</i>	24
3.4. Validación de marcadores microsatélites (SSRs) mediante PCR en tiempo real (qPCR) y análisis de fusión de alta resolución (HRM)	28
3.5. Asignación de genotipos putativos mediante el análisis de fusión de alta resolución (HRM).....	36
3.6. Validación del análisis HRM mediante secuenciación Sanger.....	47
IV. CONCLUSIONES	56
V. GLOSARIO.....	58
VI. BIBLIOGRAFÍA	61
VII. Apéndice	66
VIII. Anexos	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.2.1 Número de individuos y frutos recolectados de <i>P. punctata</i> muestreados por localidad, ordenados de norte a sur	11
Tabla 3.3.1 Características de los 22 SSRs trinucleótidos seleccionados para su validación mediante HRM y secuenciación Sanger en <i>P. punctata</i>	27
Tabla 3.5.1 Valores promedio de ciclos de cuantificación (Cq), temperatura de fusión (Tm), y porcentaje de confianza en asignación de genotipos por población y genotipo en individuos de madres e hijas de <i>P. punctata</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.1 Mapa de los sitios de muestreo de *P. punctata*. San Ramón (punto lila), Ramadillas (punto verde), Colcura (punto azul) y Los Barros (punto fucsia)8

Figura 2.2.1 Material vegetal recolectado de *P. punctata*. En (a) Dr. Diego Muñoz Concha y ayudante de terreno en quebrada Colcura. Entre (b) y (d) ejemplares de Pitao adultos, rebrotes y ramillas apicales. Frutos recolectados de madre 0117 (Ramadillas)..... 10

Figura 3.1.1 Siembra y germinación de semillas de *P. punctata* en condiciones de invernadero en un jardín común. Las semillas germinadas corresponden a los frutos de la madre SR272 (ID82) colectada en San Ramón (a) y (b). De (c) a (f) se observa el crecimiento inicial de las plántulas..... 21

Figura 3.1.2 Registro del establecimiento y desarrollo de las plántulas de *P. punctata*. En (a) Semillas de San Ramón correspondiente a hijas de SR272 (ID82). De (b) a (e) plántulas hijas de las madres SR309, R17, SR272 y B216, respectivamente. El establecimiento y crecimiento de las plántulas en condiciones de vivero se muestran de (f) a (j) 22

Figura 3.2.1 Integridad y cuantificación relativa de ADN genómico de *P. punctata* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Lambda (λ): ADN control, Colcura (C), Los Barros (B), San Ramón (SR) y Ramadillas (R ó Ra) 23

Figura 3.2.2 Integridad y cuantificación relativa de ADN genómico de *P. punctata* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. ADN control: Lambda (λ). Las muestras corresponden a las plántulas cultivadas en condiciones de invernadero (Colcura 201 y 205, Los Barros 149 y 216, San Ramón 272 y 309, y Ramadillas R17)..... 24

Figura 3.3.1 Frecuencia de clasificación de los motivos SSRs detectados según el número de repeticiones utilizando el genoma de referencia de *Citrus sinensis*. Cada barra representa la cantidad total de SSRs con un número específico de repeticiones, desglosada por motivo repetitivo 26

Figura 3.4.1 Curvas de amplificación del marcador SSR608 obtenidas mediante qPCR a partir de ADN genómico de *P. punctata* (muestras HJ2, C178 y R344, en duplicado). La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software 29

Figura 3.4.2 Productos de qPCR correspondientes a los marcadores SSR521, SSR880, SSR283, SSR608, SSR579 y SSR934 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X. Las muestras corresponden a ADN genómico de *P. punctata* HJ2 (H), C178 (C) y R344 (R); M: marcador de peso molecular 100 pb..... 30

Figura 3.4.3 Curvas de amplificación del marcador SSR521 obtenidas mediante qPCR a partir de ADN genómico de *P. punctata* (HJ2, C178 y R344, en

duplicado). En el recuadro se muestra la visualización del producto amplificado en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X. La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software 31

Figura 3.4.4 Curvas de disociación térmica (T_m) de los amplicones obtenidos con el marcador SSR521 a partir de ADN genómico de *P. punctata* y visualización de los productos en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X. La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software 32

Figura 3.4.5 Evaluación de la amplificabilidad y especificidad del marcador SSR880 en muestras de ADN genómico de *P. punctata* mediante qPCR y análisis de curvas de disociación. Las muestras corresponden a HJ2 (Particular), C178 (Colcura) y R344 (Ramadillas), en duplicado. Las líneas rojas en ambas gráficas indican el umbral de detección de fluorescencia, mientras que la línea rosada corresponde al control NTC (agua)..... 34

Figura 3.4.6 Curvas de amplificación obtenidas mediante qPCR para el marcador SSR193 en muestras de ADN genómico de *P. punctata*, donde, HJ2 (**H**), C186 (**C**) y R344 (**R**) y agua como control negativo (**-C**). El umbral de detección fue asignado automáticamente por el software 35

Figura 3.4.7 Curvas de disociación térmica (T_m) de los amplicones obtenidos con el marcador SSR193 en muestras de *P. punctata* provenientes de Colcura

(C186), particular (HJ2) y Ramadillas (R344). La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software	36
Figura 3.5.1 Curvas de disociación térmica ($-dF/dT$) de los amplicones obtenidos con el marcador SSR193 en muestras de <i>P. punctata</i> . Cada curva corresponde a un genotipo putativo distinto. La línea roja indica el umbral de detección	37
Figura 3.5.2 Perfiles de fusión de alta resolución (HRM) normalizados correspondientes a 11 genotipos putativos de <i>P. punctata</i> obtenidos con el marcador SSR193. Cada color representa un genotipo distinto	38
Figura 3.5.3 Gráfico de diferencia de fluorescencia (difference plot) entre los perfiles de fusión de alta resolución correspondientes a 11 genotipos putativos de <i>P. punctata</i> obtenidos con el marcador SSR193	39
Figura 3.5.4 Perfiles de fusión de alta resolución (HRM) normalizados correspondientes a ocho genotipos putativos de <i>P. punctata</i> obtenidos con el marcador SSR182. Cada color representa un genotipo distinto	40
Figura 3.5.5 Gráfico de diferencia de fluorescencia (difference plot) entre los perfiles de fusión de alta resolución correspondientes a ocho genotipos putativos de <i>P. punctata</i> obtenidos con el marcador SSR182. Cada curva representa un genotipo putativo, respecto a la curva central de referencia (genotipo H)	41

Figura 3.5.6 Distribución de frecuencias de los genotipos detectados mediante el marcador microsatélite SSR193 en cuatro localidades de <i>P. punctata</i> (Colcura, Los Barros, Ramadillas y San Ramón).....	46
Figura 3.6.1 Alineamiento de secuencias obtenidas por Sanger del marcador SSR193 en <i>P. punctata</i> . Se muestran secuencias representativas de los distintos genotipos identificados mediante HRM (D, L, E, K y B). El motivo repetitivo (CTC) ⁶ se destaca en la región central del alineamiento	49
Figura 3.6.2 Alineamiento múltiple de secuencias obtenidas por secuenciación Sanger del marcador SSR193 en <i>P. punctata</i> . Se muestran amplicones representativos de distintos individuos y genotipos identificados mediante análisis HRM. El motivo repetitivo (CTC) ⁶ se observa en la región central del alineamiento	51
Figura 3.6.3 Comparación entre perfiles de electroforesis capilar y análisis de fusión de alta resolución (HRM) de 5 genotipos analizados con el marcador SSR193 en muestras representativas de <i>P. punctata</i> . (a) Perfiles de fragmentos fluorescentes analizados con Fragment Analyzer de 5 genotipos diferentes. Se observan 5 alelos distintos (130 pb, 131 pb, 132 pb, 146 pb y 147 pb) formando 3 homocigotos y 2 heterocigotos. (b) Curvas de disociación térmica con distintas formas y pequeños desplazamientos de temperatura. (c) Gráfico HRM normalizado muestra curvas con uno o más puntos de transición térmica. (d)	

Gráfico de diferencia de fluorescencia con genotipo B (central) como referencia para la discriminación de genotipos..... 52

Figura 3.6.4 Cromatogramas representativos de la secuenciación Sanger del marcador microsatélite SSR182 en muestras representativas de *P. punctata*. Las secuencias muestran una adecuada calidad de lectura en la región del microsatélite y en las zonas flanqueantes 53

RESUMEN

El análisis de fusión de alta resolución se ha consolidado como una herramienta eficiente para la genotipificación de marcadores microsatélites en diversos sistemas biológicos. En este contexto, el estudio tuvo como objetivo validar el uso de esta metodología para la discriminación de genotipos basada en microsatélites, utilizando como modelo la especie endémica y amenazada *Pitavia punctata* (Ruiz&Pav.) Mol. A partir de una base de datos previa de microsatélites, se seleccionó un conjunto de marcadores candidatos que fueron evaluados mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y análisis de fusión. Dos marcadores polimórficos fueron validados, destacando uno de ellos por su alto poder discriminante. Este marcador permitió identificar múltiples genotipos en individuos provenientes de cuatro poblaciones naturales, evidenciando variación genética y diferencias en la distribución de genotipos entre localidades. La concordancia entre los genotipos obtenidos mediante análisis de fusión y la variación alélica determinada mediante análisis de fragmentos fluorescentes confirmó que las diferencias observadas en los perfiles de fusión reflejaron variación genética real, asociada tanto a cambios en la longitud del microsatélite como a variaciones en regiones flanqueantes. Aunque el número de marcadores polimórficos fue limitado, los resultados demostraron que esta aproximación constituye una estrategia eficaz y costo-efectiva para la validación y genotipificación de microsatélites en especies no modelo, proporcionando una base metodológica para estudios futuros en genética de la conservación.

ABSTRACT

High-resolution melting analysis has emerged as an efficient tool for genotyping microsatellite markers across diverse biological systems. In this context, the present study aimed to validate the use of this approach for microsatellite-based genotype discrimination, using the endangered endemic species *Pitavia punctata* (Ruiz&Pav.) Mol. as a model. A set of candidate microsatellite markers was selected from a previously generated database and evaluated using real-time polymerase chain reaction followed by melting analysis. Two polymorphic markers were successfully validated, with one showing a high discriminatory power. This marker enabled the identification of multiple genotypes among individuals from four natural populations, revealing genetic variation and differences in genotype distribution among localities. The concordance between genotypes obtained through melting analysis and allelic variation determined by fluorescent fragment analysis confirmed that the observed differences in melting profiles reflected true genetic variation, associated with both changes in microsatellite length and sequence variation in flanking regions. Although the number of polymorphic markers was limited, the results demonstrated that this approach constitutes an effective and cost-efficient strategy for microsatellite validation and genotyping in non-model species, providing a methodological basis for future studies in conservation genetics.

I. INTRODUCCIÓN

El análisis de fusión de alta resolución (HRM, High Resolution Melting) se ha consolidado como una herramienta eficiente para la genotipificación rápida, sensible y de bajo costo en diversos contextos biológicos. Desde su desarrollo a comienzos de la década de 2000, HRM ha evolucionado desde una metodología inicialmente enfocada en la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) hacia una plataforma versátil aplicable al análisis de marcadores microsatélites, autenticación de especies y estudios de diversidad genética (Distefano et al., 2012; Mackay et al., 2008). Su formato de tubo cerrado reduce el riesgo de contaminación y acelera la obtención de resultados, lo que ha favorecido su uso en fitomejoramiento, ciencia forense y autenticación de alimentos (Gomes et al., 2018; Jiang et al., 2020). Asimismo, su capacidad para detectar variaciones sutiles de secuencia, incluidos SNPs en regiones flanqueantes de microsatélites, amplía su poder discriminante respecto de métodos electroforéticos tradicionales (Distefano et al., 2012; Lombal et al., 2015).

A pesar de estas ventajas, la aplicación de HRM al análisis de microsatélites aún presenta desafíos asociados a la sensibilidad, especificidad y precisión, especialmente en muestras complejas o degradadas (Li et al., 2018; Słomka et al., 2017). Si bien esta metodología ha sido aplicada exitosamente en distintas especies y tipos de muestra, persisten brechas en la validación de su desempeño en especies no modelo y en la estandarización de protocolos para la genotipificación de SSRs (Barrias et al., 2024; García-Valencia et al., 2022; Xu et al., 2023). En particular, se ha reportado que la resolución de HRM puede verse limitada en amplicones con pequeñas diferencias de longitud o haplotipos con estructuras complejas, lo que dificulta la discriminación de genotipos estrechamente relacionados. Estas limitaciones evidencian la necesidad de evaluar sistemáticamente las condiciones de reacción, la selección de marcadores y las estrategias de análisis de datos para cada sistema biológico de estudio (Chatzidimopoulos et al., 2014; Chatzidimopoulos et al., 2022; Ebili & Ilyas, 2015; Słomka et al., 2017).

En este contexto, el análisis HRM puede entenderse como una técnica posterior a la PCR que detecta el comportamiento de fusión del ADN, el cual está influenciado por la longitud de la secuencia, el contenido de GC y la composición nucleotídica (Mackay et al., 2008; Mader et al., 2008). Los microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats), caracterizados por su repetición en tándem y

elevado polimorfismo, constituyen marcadores particularmente adecuados para su análisis mediante HRM debido a su herencia codominante y amplia distribución en el genoma (Distefano et al., 2012; Xanthopoulou et al., 2014). La interacción entre los perfiles de las curvas de fusión y la variación de los microsatélites sustenta la capacidad del método. Esto permite discriminar y validar genotipos, incluso en sistemas con recursos genómicos limitados (Arthofer et al., 2011; Ricchi et al., 2011). Este enfoque resulta especialmente relevante en especies con escasas herramientas genético-moleculares disponibles.

Pitavia punctata (Ruiz & Pav.) Molina, conocida como Pitao o Canelillo, es un árbol endémico y monotípico del centro-sur de Chile, perteneciente a la familia Rutaceae, cuya distribución restringida y estado de conservación la posicionan como una especie de alto interés para la genética de la conservación. Actualmente clasificada como “En Peligro” según la IUCN (2021), sus poblaciones altamente fragmentadas y aisladas, enfrentan un riesgo de pérdida de variabilidad genética y de reducción de su capacidad adaptativa. A pesar de su relevancia ecológica, los estudios genéticos en la especie han sido escasos y se han basado principalmente en marcadores dominantes, los cuales han evidenciado niveles reducidos de variabilidad genética a escala poblacional (Venegas Díaz, 2015). Esta limitada disponibilidad de herramientas moleculares

codominantes restringe la posibilidad de caracterizar con mayor resolución la estructura genética de sus poblaciones.

En este contexto, el desarrollo de marcadores microsatélites específicos para *P. punctata* resulta particularmente relevante, dado que actualmente no se dispone de un conjunto validado de SSRs que permita su caracterización genética. En este escenario, el análisis HRM no solo constituye una herramienta de genotipificación, sino también una estrategia eficiente para acelerar la identificación y validación de loci polimórficos, reduciendo los costos y tiempos asociados a metodologías tradicionales. Contar con este tipo de marcadores es fundamental para evaluar la diversidad genética, detectar procesos de aislamiento o flujo génico e identificar unidades relevantes para la conservación de la especie (Young et al., 1996; Primack & Rozzi, 2001).

Considerando lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo validar marcadores microsatélites en *P. punctata* mediante análisis de fusión de alta resolución (HRM), con confirmación de la variación alélica a través de secuenciación Sanger. Esta aproximación busca contribuir al conocimiento de la variabilidad genética de la especie y proporcionar herramientas moleculares que apoyen futuros estudios de genética de la conservación y estrategias de manejo orientadas a su preservación.

1.1 Hipótesis

La genotipificación de marcadores microsatélites mediante HRM permite discriminar genotipos de *P. punctata*, mostrando concordancia con métodos de referencia basados en análisis de fragmentos fluorescentes y secuenciación Sanger.

1.2 Objetivo general

Validar la genotipificación de marcadores microsatélites mediante análisis de fusión de alta resolución (HRM) para la discriminación de genotipos en *P. punctata*, utilizando análisis de fragmentos fluorescentes y secuenciación Sanger como métodos de referencia.

1.3 Objetivos específicos

1.3.1. Genotipificar individuos de *P. punctata* utilizando marcadores microsatélites mediante análisis HRM.

1.3.2. Evaluar la concordancia entre los genotipos obtenidos mediante HRM y aquellos determinados mediante análisis de fragmentos fluorescentes y secuenciación Sanger.

II. METODOLOGÍA

2.1. Sitio de estudio y área de muestreo

En el contexto del proyecto FIBN-CONAF 005-2022 “Alteración del hábitat de *P. punctata*: evaluación de parámetros de desempeño individual y poblacional, genéticos, y modelación a escala paisaje”, se contemplaron a lo largo de la distribución geográfica de *P. punctata* 13 lugares con presencia de la especie, de los cuales cuatro, son los abordados en este estudio (Figura 2.1.1). Dos localidades pertenecen a la región del Maule: San Ramón (Constitución), y Ramadillas (Pelluhue), y las otras dos pertenecen a la región del Biobío: Colcura (Lota) y Los Barros (Nacimiento). Durante el proyecto se estimó el nivel de alteración del hábitat mediante un índice numérico asociado a una rúbrica con 19 elementos de evaluación en terreno (Anexo 1-2). Dichos niveles fueron considerados para la selección de las cuatro poblaciones muestreadas en este estudio, donde Los Barros y Ramadillas presentaban un índice de alteración menor al 20%, Colcura con un índice cercano al 30% y San Ramón con un valor aproximado del 70% de alteración (Anexo 3).

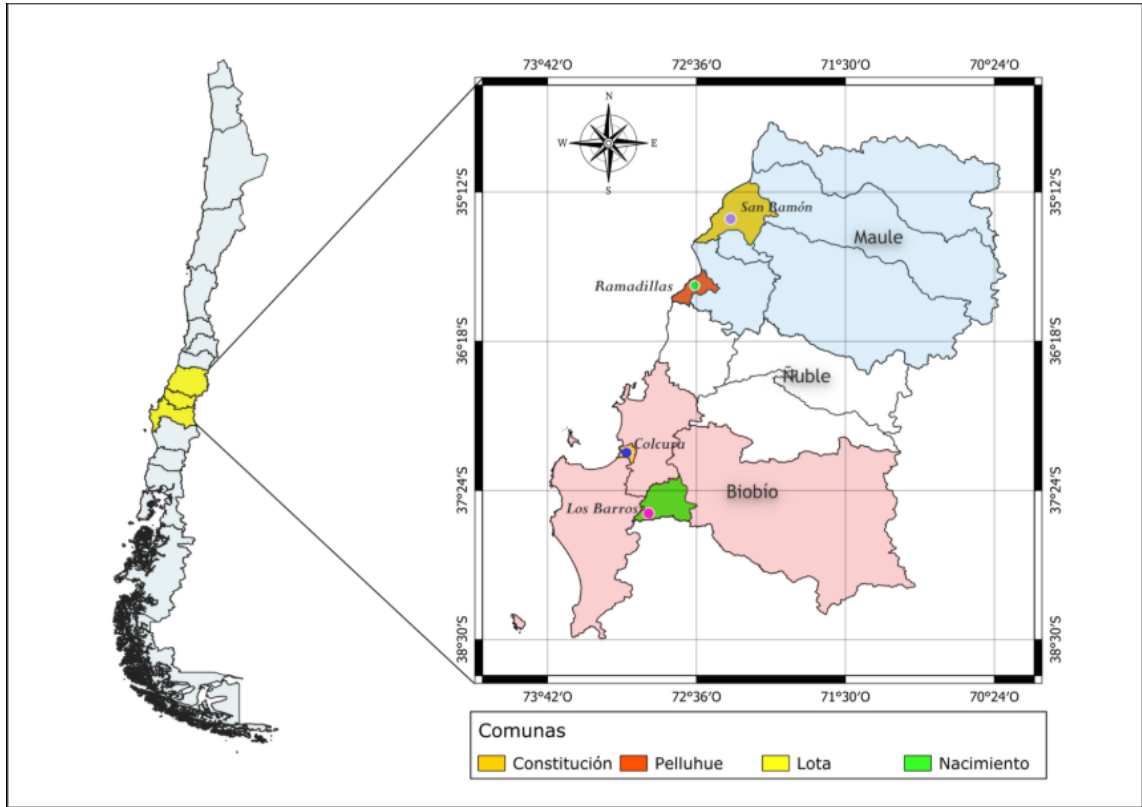


Figura 2.1.1 Mapa de los sitios de muestreo de *P. punctata*. San Ramón (punto lila), Ramadillas (punto verde), Colcura (punto azul) y Los Barros (punto fucsia)

2.2. Recolección del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en predios de privados y en algunos casos en terrenos de particulares. Se cortaron ramillas de 149 individuos en total, las cuales presentaban hojas completamente extendidas, hojas nuevas, yemas axilares y ápice caulinar (Figura 2.2.1). Las ramillas fueron envueltas en papel absorbente, introducidas en bolsas ziploc y rotuladas con el código GPS asociado a las coordenadas geográficas. Para el estudio intrafamiliar fueron recolectados frutos de siete individuos (Tabla 2.2.1), procurando recoger aquellos que se encontraban en un radio no mayor al de la copa de cada planta madre y lo suficientemente distantes de otros individuos en estado reproductivo. Las muestras fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Epigenética Vegetal (LEV) de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción y almacenadas a 4° C hasta su procesamiento y posterior extracción de ADNg. Los frutos una vez desinfectados con etanol al 70% y papel absorbente, se introdujeron en bolsas ziploc para su germinación (Figura 2.2.1).



Figura 2.2.1 Material vegetal recolectado de *P. punctata*. En (a) Dr. Diego Muñoz Concha y ayudante de terreno en quebrada Colcura. Entre (b) y (d) ejemplares de Pitao adultos, rebrotes y ramillas apicales. Frutos recolectados de madre 0117 (Ramadillas)

Tabla 2.2.1 Número de individuos y frutos recolectados de *P. punctata* muestreados por localidad, ordenados de norte a sur

Loc.	Prop.	Reg.	Com.	Lat.	Long.	N° Ind.	ID/GPS	N° Frutos
San Ramón	Arauco	Maule	Constitución	35°23'51.12"S	72°20'50.43"O	34	272	69
San Ramón	Arauco	Maule	Constitución	35°23'51.12"S	72°20'50.43"O	34	309	44
Ramadillas	Particular	Maule	Pelluhue	36° 0'4.05"S	72°40'49.48"O	46	17	46
Colcura	Arauco	Biobío	Lota	37° 7'22.74" S	73° 7'2.34" O	20	201	12
Colcura	Arauco	Biobío	Lota	37° 7'22.74" S	73° 7'2.34" O	20	205	23
Los Barros	CMPC	Biobío	Nacimiento	37°35'50.17"S	72°58'54.12"O	49	149	28
Los Barros	CMPC	Biobío	Nacimiento	37°35'50.17"S	72°58'54.12"O	49	216	45
Total						149		223

Nota: Loc: Localidad, Prop: Propietario, Reg: Región, Com: Comuna, Lat: Latitud, Long: Longitud, Ind: Individuos, ID/(GPS): Código GPS.

Las coordenadas fueron facilitadas por el proyecto FIBN-CONAF 005/2022.

2.3. Establecimiento de jardín común

El jardín común tuvo como propósito principal asegurar la disponibilidad de material vegetal homogéneo para los análisis moleculares posteriores, no siendo considerado como una variable experimental dentro del presente estudio. Para ello se sembraron, en condiciones de invernadero, semillas provenientes de frutos recolectados en las cuatro localidades estudiadas (San Ramón, Ramadillas, Colcura y Los Barros). La germinación y viverización se ajustó al método de (Le Quesne & Medina, 1998) y se llevó a cabo en el vivero de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción.

2.4. Extracción de ADN genómico de *P. punctata*

Para la extracción de ADNg se utilizaron 60 mg de hojas nuevas y frescas de preferencia y sin daños evidentes por herbívora, tanto para las muestras obtenidas en terreno, como para aquellas plántulas establecidas en invernadero. La extracción se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de extracción DNeasy Plant Mini Kit QIAGEN ajustado levemente para la especie (Apéndice 1). La integridad de ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, visualizado en transiluminador y fotografiado con una cámara CANON PowerShot SX230.

2.5. Selección de marcadores SSRs a partir de una base preexistente

En el contexto del proyecto FIBN CONAF 005/2022 y gracias a la colaboración del Dr. Oscar Toro de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, se generó una base de datos de regiones microsátélites (SSRs) para *P. punctata*, a partir del ensamblaje de 166.648 contigs mediante el programa Spades (Prijbelski et al. 2020) y su posterior análisis comparativo mediante la herramienta BLAST con el genoma de referencia de *Citrus sinensis* cultivar Valencia sweet Orange. Este trabajo fue desarrollado por el Dr. Oscar Toro (Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción) quien identificó una gran cantidad de loci SSR potenciales utilizando el software MISA (Thiel et al, 2003). A partir de esta base de datos preexistente, en el presente estudio se seleccionó un subconjunto de 22 marcadores SSR candidatos, considerando los siguientes criterios: SSRs con motivos desde mono a hexanucleótidos y se estableció el valor 4 como número mínimo de unidades repetidas, el tamaño de dichas unidades se fijó en trinucleótidos. Para los cebadores se consideraron los siguientes parámetros: un tamaño de amplicón entre 90-230 pb, tamaño del cebador entre 18-27 pb, temperatura de hibridación entre 55-62° C y un porcentaje de GC entre 30 y 70%.

La validación funcional de estos marcadores, mediante PCR convencional, PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución (HRM), constituye el eje

central del presente trabajo. Los partidores para los marcadores se pueden consultar en (Apéndice 2)

2.6. Validación de marcadores microsatélites (SSRs) mediante PCR en tiempo real (qPCR) y análisis de fusión de alta resolución (HRM)

2.6.1. Protocolo para qPCR y HRM.

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real mediante el termociclador de inducción magnética MIC. Para la preparación de las reacciones se utilizó el sistema automatizado de manejo de líquidos Myra, controlado y programado por el software BMS Workbench, el cual permitió monitorear de igual forma la reacción de PCR en tiempo real. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 μ l: 4 μ l de ADN molde diluido en razón de 1:10, 0.3 μ l de cada cebador (directo y reverso) a una concentración de 10 μ M, 4 μ l de Master Mix HOT FIREPol Evagreen Mix Plus 5X (con y sin ROX) y agua ultrapura para completar el volumen total. Luego de los 40 ciclos de la PCR se llevó a cabo una denaturación inicial de 95°C por 15 segundos, disminuyendo la temperatura a 55° C para la fase de alineamiento por 20 segundos y un aumento nuevamente a 72° C por 30 segundos para la fase de extensión. Para el análisis de fusión de alta resolución (HRM) se colectaron datos de fluorescencia a partir de la

denaturación del producto PCR aumentando la temperatura en una rampa desde los 60° C a una velocidad de 0.1° C /s hasta alcanzar los 95° C.

2.6.2. Criterios de selección de marcadores SSRs para análisis HRM

Para seleccionar los partidores SRRs más eficientes, polimórficos e informativos diseñados para *P. punctata*, se aplicaron tres criterios de selección a partir de los ensayos de qPCR:

- a. Eficiencia y ciclos cuantificación (Cq): Fueron consideradas amplificaciones tardías aquellas que sobrepasaban los 30 ciclos, es decir, un $Cq > 30$, ya que, de acuerdo con lo señalado en “Guide to High Resolution Melting Analysis”, una amplificación tardía puede no alcanzar la meseta o *plató* y la resolución de HRM podría verse afectada debido a la menor ganancia global de fluorescencia. Tanto la eficiencia de amplificación como el valor de Cq fue calculado automáticamente por el software BMSWorkbench utilizando el método predeterminado LinRegPCR, descrito por (Ramakers et al., 2003).
- b. Análisis de fusión: Para evaluar la especificidad y carácter polimórfico de los marcadores, se evaluó la temperatura máxima de disociación (T_m) de una muestra a partir de los datos de fusión. Las curvas de fusión debían mostrar diferencias visuales tanto en la forma de la curva como en el rango de fusión. Además, si bien no existe un umbral fijo de diferencia de T_m en

procedimientos de genotipificación de SSRs, se propuso como medida exploratoria, diferencias entre 2 o más muestras de 0,2° C como mínimo, 0,5° C confiable o $\geq 0,8^{\circ}\text{C}$ idealmente. No obstante, el criterio de forma y rango de fusión primó por sobre los valores de T_m .

- c. Especificidad: Para descartar amplificaciones inespecíficas o formación de estructuras secundarias como dímeros de cebadores, se visualizaron los productos PCR en geles de agarosa al 2%. La evaluación semicuantitativa mediante electroforesis permitió estimar el tamaño del amplicón y complementar la discriminación de marcadores potencialmente polimórficos.

2.6.3. Análisis de los perfiles de fusión y asignación de genotipos putativos mediante el análisis de fusión de alta resolución (HRM)

Para cada reacción de PCR en tiempo real se obtuvieron las curvas de fusión de los amplicones para cada marcador SSR seleccionado utilizando las herramientas que ofrece el software BMS Workbench. Los datos de fluorescencia recogidos fueron derivados automáticamente por el programa, obteniendo gráficos de fusión expresados como la derivada negativa de la fluorescencia sobre la derivada de la temperatura ($-dF/dT$) en el eje de las ordenadas (y) versus la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en el eje de las abscisas (x). A partir de estos gráficos se

obtuvieron los valores de T_m (temperatura de fusión) de cada amplicón, los cuales indican a que temperatura el producto PCR se encuentra en un 50% como ADN monocatenario y 50% bicatenario.

Mediante la herramienta de análisis HRM que posee el programa BMS Workbench, se obtuvieron los perfiles de fusión de cada amplicón, expresados como gráficos de fluorescencia normalizada versus temperatura. De los parámetros utilizados para la obtención de las curvas de HRM, los rangos de inicio y término de la fluorescencia detectada en función de la temperatura se ajustaron manualmente para cada uno de los ensayos, considerando como temperatura de inicio la más cercana al comienzo de la caída de la fluorescencia. El porcentaje de confianza para la asignación de genotipos putativos se estableció en un 95%. La asignación de los genotipos se realizó mediante la comparación de las curvas de disociación de los amplicones y seleccionando una muestra por cada genotipo putativo (o en algunos casos más de una). Luego, el programa BMS Workbench, automáticamente asignó al resto de las reacciones a un genotipo a partir de los indicados como referencia.

Para una mejor discriminación de los genotipos se obtuvieron gráficos de diferencia de fluorescencia entre las muestras, seleccionando un genotipo como curva de referencia central para la diferenciación entre genotipos putativos.

2.6.4. Secuenciación SANGER de productos PCR

Para la validación mediante secuenciación Sanger, se seleccionó al menos un amplicón representativo por cada genotipo putativo identificado mediante análisis HRM, priorizando aquellos perfiles que presentaban diferencias claras en las curvas de disociación. Este enfoque permitió contrastar directamente la asignación de genotipos obtenida por HRM con la variación real en la secuencia de ADN.

Los productos PCR correspondientes a los genotipos putativos, luego de ser caracterizados en gel de agarosa al 2% fueron enviados al Laboratorio AUSTRAL-omics del campus Isla Teja, Valdivia, de la Universidad Austral de Chile para ser secuenciados mediante el analizador de ADN ABI 3500. El conjunto de muestras secuenciadas con SANGER (Apéndice 3) fue seleccionado a partir de los resultados del análisis HRM. La visualización del cromatograma y limpieza de las secuencias se realizó con el software UGENE. Posteriormente se analizaron las secuencias y se identificaron las regiones microsatélites esperadas, así como la longitud del motivo repetitivo y las posibles variantes alélicas presentes. Finalmente se llevó a cabo la comparación de los perfiles de fusión de alta resolución (HRM) con el producto secuenciado para validar la asignación de genotipos putativos.

2.7. Caracterización preliminar de variabilidad genética

En vista de que el número de marcadores polimórficos validados fue reducido ($n = 2$), el análisis genético realizado en este estudio se enfocó en la caracterización preliminar de la variabilidad genética, basada en la distribución de genotipos obtenidos mediante análisis de fusión de alta resolución (HRM). En este contexto, no se realizaron inferencias poblacionales clásicas sustentadas en estimadores como heterocigosidad observada y esperada, estadísticas F o análisis de estructura genética.

Para cada uno de los marcadores seleccionados, se asignaron genotipos putativos en función de los perfiles HRM, considerando tanto las curvas de fusión normalizadas como los gráficos de diferencia de fluorescencia (*difference plots*), los cuales permitieron una discriminación más precisa entre los distintos genotipos identificados.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Establecimiento de plántulas de *P. punctata* en condiciones de vivero

De un total de 267 frutos recolectados entre las cuatro localidades (San Ramón, Ramadillas, Colcura y Los Barros), 223 semillas germinaron. Si bien no se registró un conteo de germinación con periodicidad, el porcentaje de germinación a partir del total de semillas recolectadas fue de un 83% aproximadamente, valor muy similar al registrado por (Le Quesne & Medina, 1998) para semillas de tamaño mediano (Figura 3.1.1 a-b). Luego de 78 días de sembradas las primeras semillas (17 de julio 2024), gran parte de estas ya presentaban hojas verdaderas (Figura 3.1.1 c), mientras que el resto solo contaban con cotiledones aún dentro del fruto y por sobre el sustrato (Figura 3.1.1 d-f), evidenciando una germinación de tipo epigea, característica de la especie ya descrita (Le Quesne & Medina, 1998; Muñoz Gómez, 1991) .

Tanto la formación de hojas verdaderas, como el crecimiento en altura de las plántulas fue variable entre las distintas procedencias (Figura 3.1.2 a-e), no obstante, al cabo de 118 días de sembradas, junto con la pudrición de algunos frutos (Figura 3.1.2 f), y el desarrollo paulatino de estas, gran parte de las plantas

mostró uniformidad en altura y número de nudos (Figura 3.1.2 g-j). La pérdida de semillas por pudrición también fue documentado en (Le Quesne & Medina, 1998) con valores entre 17 y 37%, y pese a no haber sido cuantificada la magnitud del daño, ha sido señalado como posible factor de incidencia en la reducción de la viabilidad (Le Quesne & Medina, 1998; Muñoz Gómez, 1991).



Figura 3.1.1 Siembra y germinación de semillas de *P. punctata* en condiciones de invernadero en un jardín común. Las semillas germinadas corresponden a los frutos de la madre SR272 (ID82) colectada en San Ramón (a) y (b). De (c) a (f) se observa el crecimiento inicial de las plántulas



Figura 3.1.2 Registro del establecimiento y desarrollo de las plántulas de *P. punctata*. En (a) Semillas de San Ramón correspondiente a hijas de SR272 (ID82). De (b) a (e) plántulas hijas de las madres SR309, R17, SR272 y B216, respectivamente. El establecimiento y crecimiento de las plántulas en condiciones de vivero se muestran de (f) a (j)

3.2. Extracción de ADN genómico de *P. punctata*

En general, el ADN extraído de los individuos georreferenciados de las cuatro poblaciones (San Ramón, Ramadillas, Colcura, Los Barros) y de las plántulas viverizadas, se presentó íntegro, libre de contaminación por otros ácidos nucleicos como ARN, y con concentraciones relativas que oscilaron entre 5 y 20

ng/μl, salvo algunas excepciones, como la muestra SR11 de la cual no se obtuvo ADN, o la muestra B4 que presentó posible presencia de ARN (Figura 3.2.1); no obstante, estas no comprometieron los análisis posteriores. En algunos casos excepcionales, el ADN extraído de las plantas viverizadas presentó cierta degradación (Figura 3.2.2), como fue el caso de la planta 18 de la madre R17.

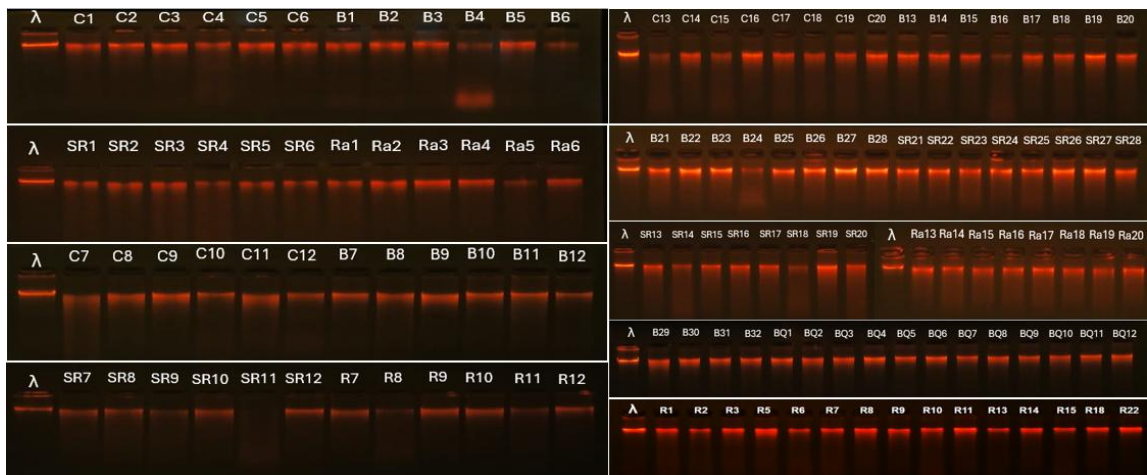


Figura 3.2.1 Integridad y cuantificación relativa de ADN genómico de *P. punctata* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Lambda (λ): ADN control, Colcura (C), Los Barros (B), San Ramón (SR) y Ramadillas (R ó Ra)

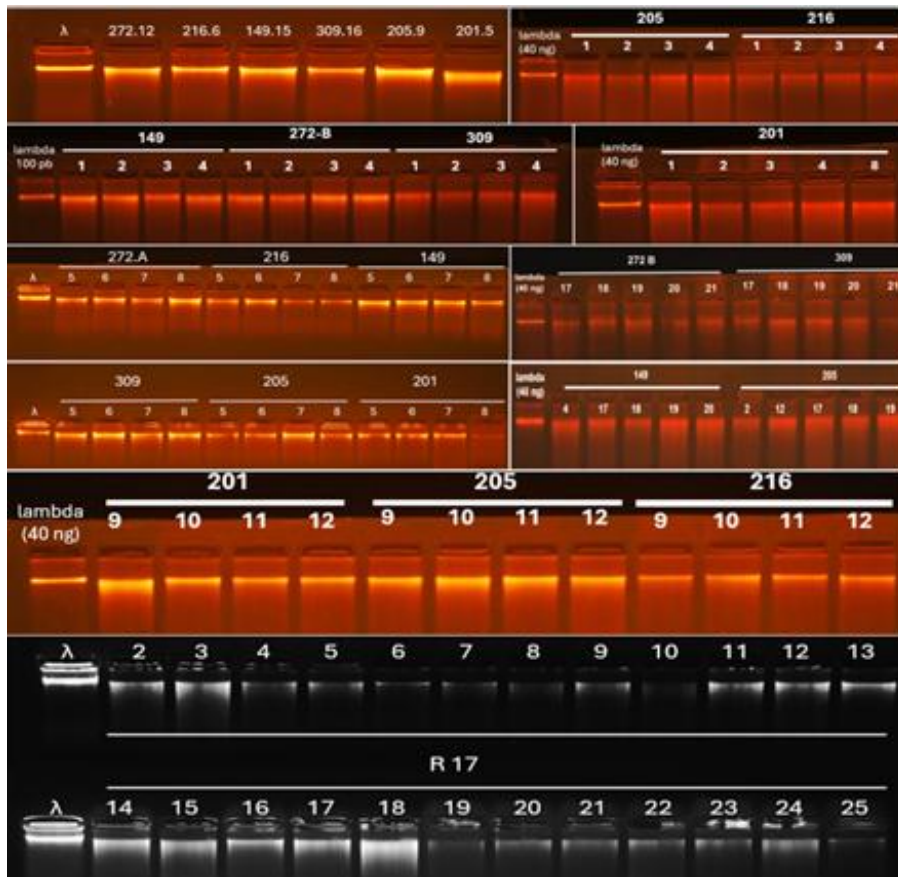


Figura 3.2.2 Integridad y cuantificación relativa de ADN genómico de *P. punctata* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. ADN control: Lambda (λ). Las muestras corresponden a las plántulas cultivadas en condiciones de invernadero (Colcura 201 y 205, Los Barros 149 y 216, San Ramón 272 y 309, y Ramadillas R17)

3.3. Detección y diseño de partidores microsatélites para *P. punctata*

En el marco del proyecto FIBN-CONAF 005-2022, el resultado obtenido por el Dr. Oscar Toro en el ensamblaje de secuencias genómicas parciales de *P. punctata* mediante el programa SPADES, fue un total de 166.648 contigs que cubrieron

aproximadamente 223 Mb. A partir de este ensamblaje, y utilizando como genoma de referencia a *Citrus sinensis* (GCA_022201045.1), se identificaron regiones microsatélites (SSRs) distribuidas a lo largo del genoma.

Fueron detectados 27.376 SSRs, distribuidos en 21.553 contigs, donde cerca del 12% de los contigs presentó al menos un motivo repetitivo. Del total de SSRs identificados, 2.191 se clasificaron como motivos compuestos y el resto como SSRs simples. La mayoría de los motivos detectados presentó entre cuatro y seis repeticiones, observándose además una distribución diferencial de los tipos de motivo repetitivo, con predominio de ciertas clases trinucleotídicas (Figura 3.3.1).

A partir de esta base de datos de SSRs previamente identificados, el presente estudio seleccionó un subconjunto de 22 marcadores candidatos para el diseño y evaluación experimental de partidores, considerando distintos tipos de motivo repetitivo y un rango de repeticiones entre cinco y nueve unidades (Tabla 3.3.1).

Esta selección tuvo como propósito evaluar el desempeño de los marcadores bajo condiciones experimentales, constituyendo el punto de partida para los ensayos de validación mediante PCR y análisis de fusión de alta resolución (HRM).

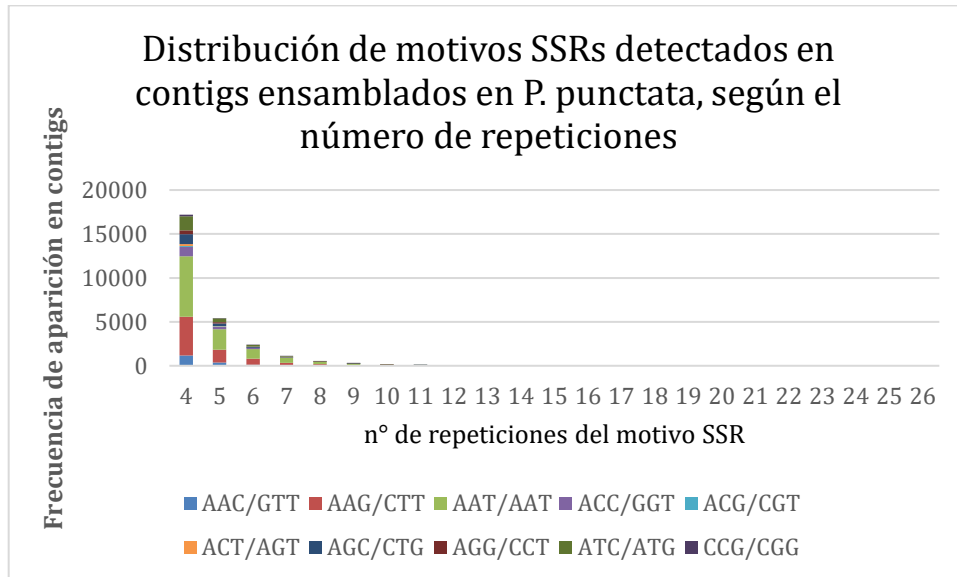


Figura 3.3.1 Frecuencia de clasificación de los motivos SSRs detectados según el número de repeticiones utilizando el genoma de referencia de *Citrus sinensis*. Cada barra representa la cantidad total de SSRs con un número específico de repeticiones, desglosada por motivo repetitivo

Tabla 3.3.1 Características de los 22 SSRs trinucleótidos seleccionados para su validación mediante HRM y secuenciación Sanger en *P. punctata*

N°	Nombre	Motivo	Tamaño de amplicón
1	SSR_Pp_165084	(CTG)6	174
2	SSR_Pp_161521	(GAA)5	197
3	SSR_Pp_196880	(TCA)6	215
4	SSR_Pp_198283	(CCA)5	245
5	SSR_Pp_22065	(TTA)5	280
6	SSR_Pp_87488	(AAT)7	180
7	SSR_Pp_115424	(CTG)6	255
8	SSR_Pp_197608	(AAT)9	181
9	SSR_Pp_115426	(CTG)6	212
10	SSR_Pp_150579	(CCA)5	183
11	SSR_Pp_97934	(CAA)6	210
12	SSR_Pp_242925	(TAT)5	179
13	SSR_Pp_174193	(CTC)6	128
14	SSR_Pp_130736	(CTC)6	279
15	SSR_Pp_15478	(AAT)7	133
16	SSR_Pp_79182	(TTC)7	236
17	SSR_Pp_56358	(ATT)5	202
18	SSR_Pp_116214	(CAG)7	192
19	SSR_Pp_174194	(CTC)6	263
20	SSR_Pp_242073	(TAA)5	251
21	SSR_Pp_42365	(ATT)8	257
22	SSR_Pp_89001	(TGA)5	219

3.4. Validación de marcadores microsatélites (SSRs) mediante PCR en tiempo real (qPCR) y análisis de fusión de alta resolución (HRM)

De los 25 marcadores microsatélites inicialmente seleccionados, 17 fueron descartados por no cumplir con al menos uno de los criterios de selección establecidos previamente. El marcador SSR608, que presentó una baja eficiencia y especificidad de amplificación (Figura 3.4.1), constituye un ejemplo representativo de los marcadores excluidos, al exhibir valores promedio de ciclos de cuantificación (Cq) de 29,95; 30,18 y 30,66 entre réplicas de las tres muestras de prueba (HJ2, C178 y R344), respectivamente.

La evaluación de los productos de qPCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% reveló la presencia de bandas tenues y de tamaño inferior a 100 pb para el marcador SSR608 (181 pb), lo que sugiere la formación de estructuras secundarias, posiblemente asociadas a dímeros de cebadores (Figura 3.4.2). De manera similar, los marcadores SSR283, SSR579 y SSR934 fueron descartados debido a la presencia de amplificaciones inespecíficas observadas en gel.

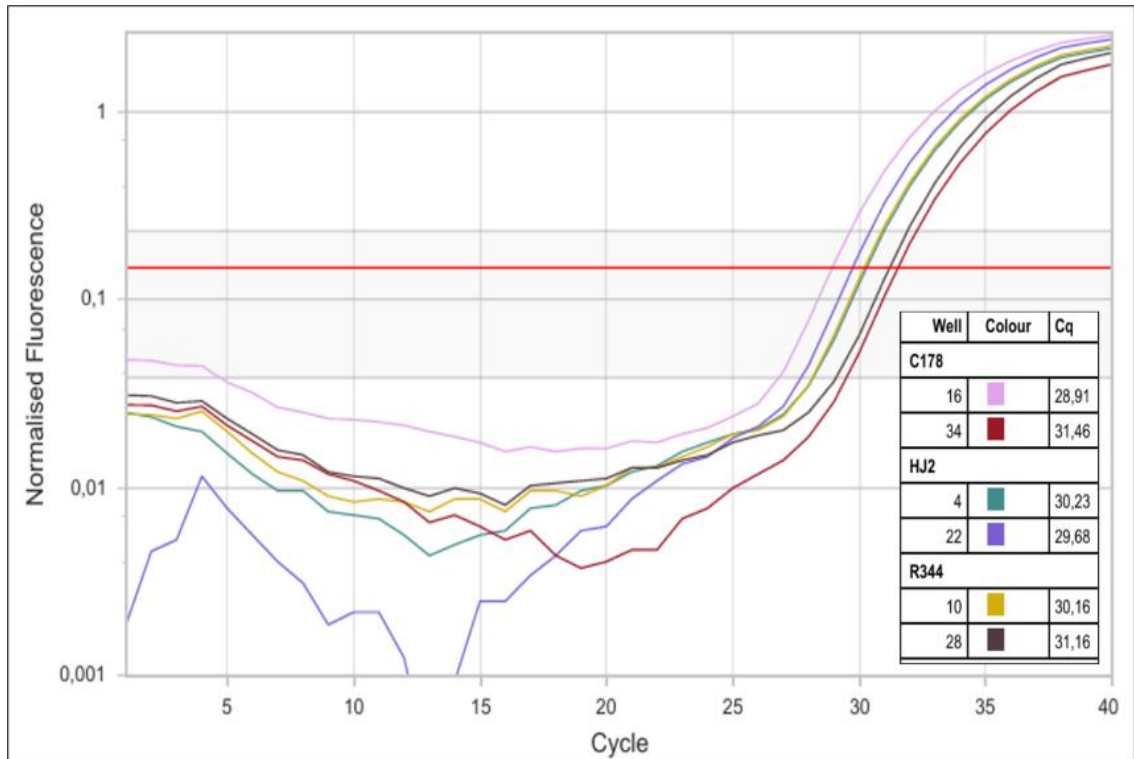


Figura 3.4.1 Curvas de amplificación del marcador SSR608 obtenidas mediante qPCR a partir de ADN genómico de *P. punctata* (muestras HJ2, C178 y R344, en duplicado). La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software

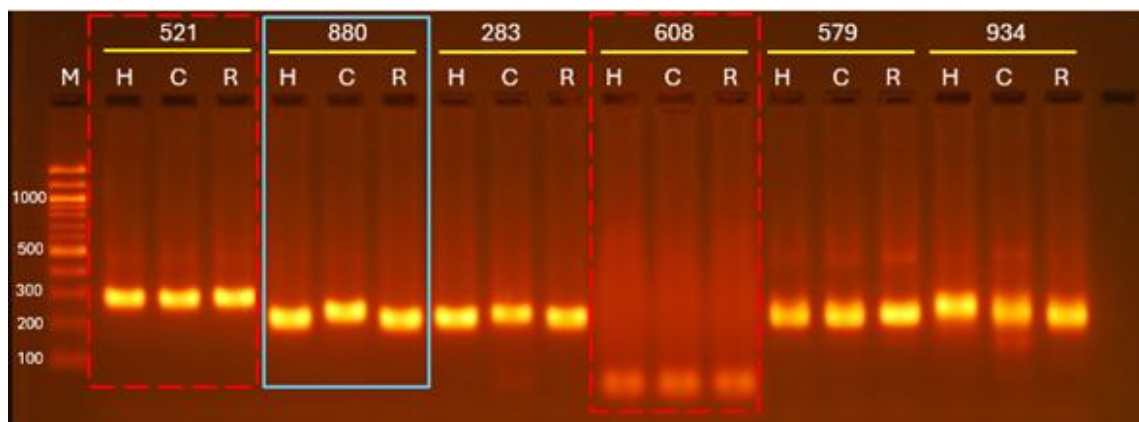


Figura 3.4.2 Productos de qPCR correspondientes a los marcadores SSR521, SSR880, SSR283, SSR608, SSR579 y SSR934 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X. Las muestras corresponden a ADN genómico de *P. punctata* HJ2 (H), C178 (C) y R344 (R); M: marcador de peso molecular 100 pb

Entre los marcadores excluidos, el SSR521 presentó valores de Cq promedio de 19,46; 22,47 y 21,69 para las muestras C178, HJ2 y R344, respectivamente (Figura 3.4.3), cumpliendo con el criterio de eficiencia de amplificación. Sin embargo, el análisis de las curvas de disociación no evidenció variaciones térmicas relevantes entre las muestras (Figura 3.4.4), con temperaturas de fusión (T_m) cercanas a los 84,2 °C, lo que sugiere la ausencia de polimorfismo detectable mediante las curvas de disociación térmica.

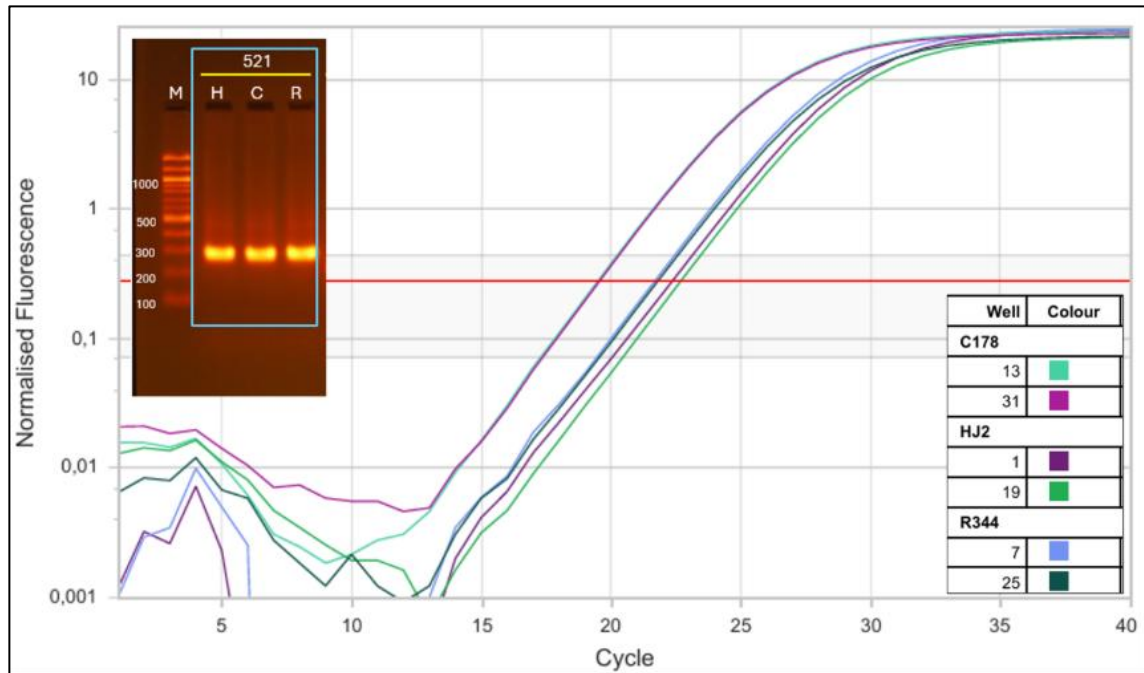


Figura 3.4.3 Curvas de amplificación del marcador SSR521 obtenidas mediante qPCR a partir de ADN genómico de *P. punctata* (HJ2, C178 y R344, en duplicado). En el recuadro se muestra la visualización del producto amplificado en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X. La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software

La visualización de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% mostró bandas únicas de aproximadamente 300 pb para el marcador SSR521 (Figura 3.4.4), no obstante, el tamaño del amplicón resultó ser mayor al esperado (197 pb), por tanto, fue excluido del análisis posterior, pese a su adecuada eficiencia de amplificación.

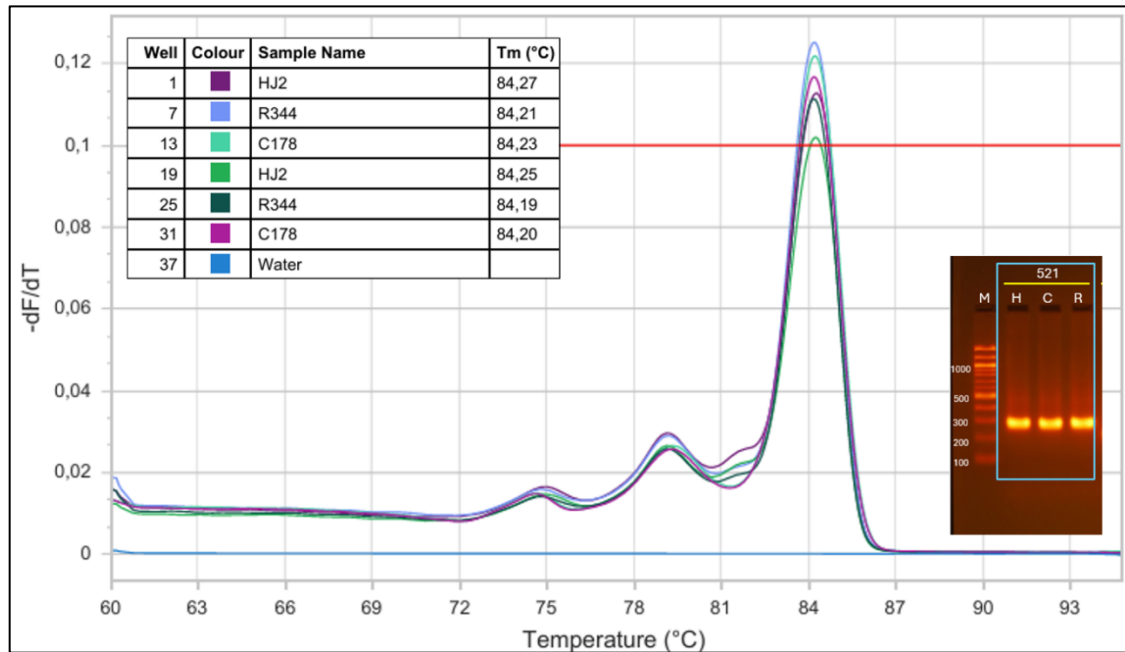


Figura 3.4.4 Curvas de disociación térmica (Tm) de los amplicones obtenidos con el marcador SSR521 a partir de ADN genómico de *P. punctata* y visualización de los productos en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X. La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software

Para el marcador SSR880 se obtuvieron valores de ciclos de cuantificación (Cq) dentro del rango aceptable (>20 y <30). Los amplicones mostraron dos perfiles diferentes entre las muestras, por un lado, HJ2 y C178 presentaron un solo punto de fusión del ADN, con valores entre amplicones de 76,62 y 76,79 °C, con una desviación estándar de 0,068 °C, mientras que en R344, se obtuvieron amplicones con dos rangos de disociación térmica (“hombros”), uno por sobre el umbral de detección y otro por debajo (Figura 3.4.5).

Si bien no existe un consenso sobre valores absolutos mínimos de diferencia de temperatura de fusión (ΔT_m) por encima de los cuales un marcador SSR pueda ser considerado polimórfico, (Arthofer et al., 2011) señalan que loci con rangos de T_m muy estrechos presentan una menor probabilidad de revelar polimorfismo, no obstante, el análisis visual del desplazamiento entre los perfiles de fusión expresados como $-dF/dT$ versus temperatura permite estimar de manera preliminar el potencial polimórfico de un locus entre distintas muestras (Lombal et al., 2015).

En este sentido, la reducida variación térmica observada entre las muestras HJ2, C178 y R344 en uno de los puntos de fusión excluyó al marcador SSR880 de los análisis posteriores pese haber sido un potencial candidato para discriminar individuos heterocigotos, dada a la presencia de dos rangos de fusión (“hombros”) en el perfil de disociación térmica (Lombal et al., 2015).

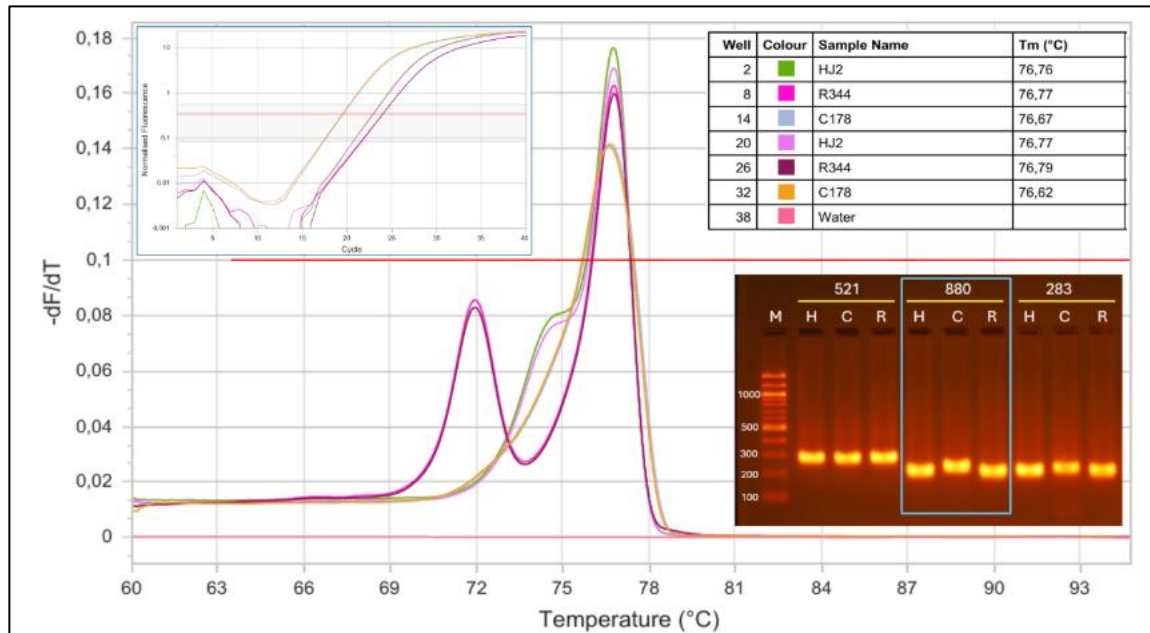


Figura 3.4.5 Evaluación de la amplificabilidad y especificidad del marcador SSR880 en muestras de ADN genómico de *P. punctata* mediante qPCR y análisis de curvas de disociación. Las muestras corresponden a HJ2 (Particular), C178 (Colcura) y R344 (Ramadillas), en duplicado. Las líneas rojas en ambas gráficas indican el umbral de detección de fluorescencia, mientras que la línea rosada corresponde al control NTC (agua)

El flujo de trabajo permitió identificar tres marcadores SSR potencialmente polimórficos (SSR193, SSR182 y SSR478) de un total de 22 evaluados. Entre ellos, el marcador SSR193 cumplió con los tres criterios de selección establecidos (eficiencia, especificidad de amplificación y variación térmica), con valores de Cq óptimos y relativamente estables entre réplicas (3.4.6) y diferencias de Tm $\geq 0,5$ °C entre al menos dos muestras distintas, con diferencias visuales

en los desplazamientos y forma de las curvas de fusión, sugiriendo así polimorfismo atribuible a diferencias alélicas (Figura 3.4.7).

Por otra parte, el gel de agarosa al 2% (TBE 1X) no evidenció amplificaciones inespecíficas, formación de dímeros de cebadores y a su vez permitió estimar un tamaño de amplicón muy cercano al esperado (128 pb), respaldando su idoneidad para los análisis posteriores de genotipificación mediante HRM.

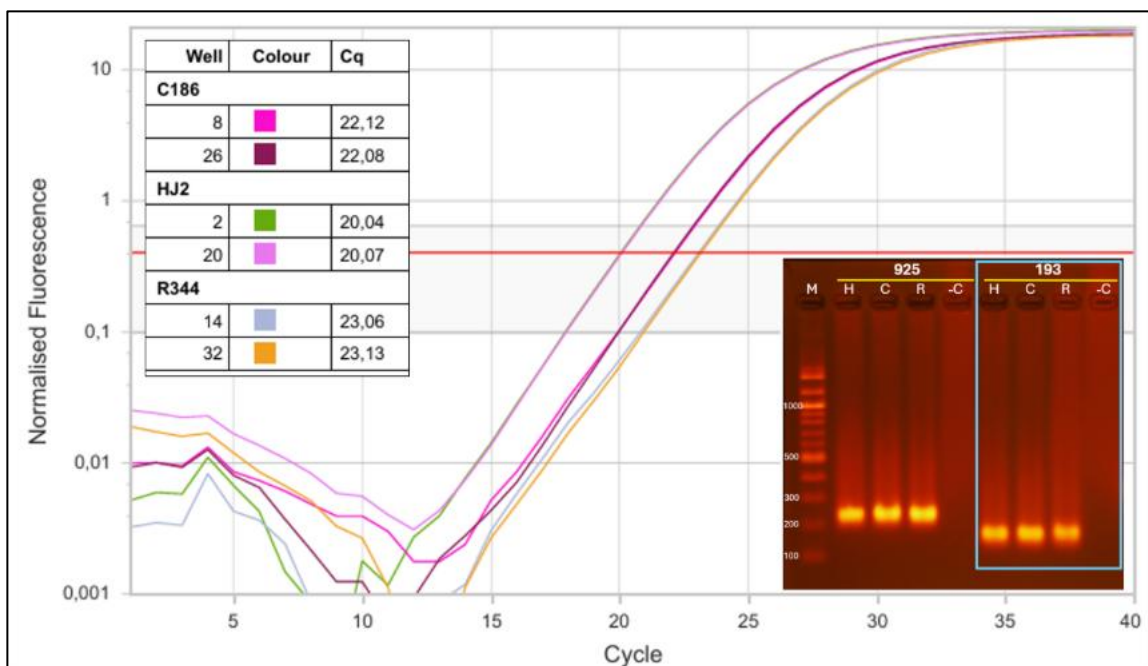


Figura 3.4.6 Curvas de amplificación obtenidas mediante qPCR para el marcador SSR193 en muestras de ADN genómico de *P. punctata*, donde, HJ2 (H), C186 (C) y R344 (R) y agua como control negativo (-C). El umbral de detección fue asignado automáticamente por el software

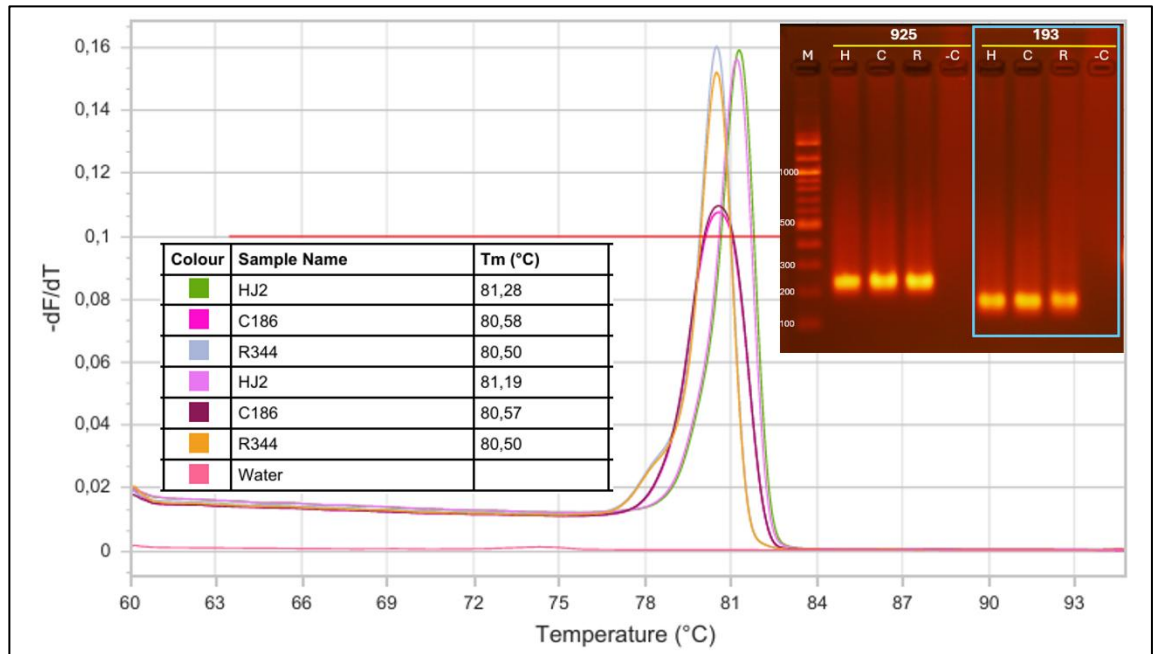


Figura 3.4.7 Curvas de disociación térmica (Tm) de los amplicones obtenidos con el marcador SSR193 en muestras de *P. punctata* provenientes de Colcura (C186), particular (HJ2) y Ramadillas (R344). La línea roja indica el umbral de detección asignado automáticamente por el software

3.5. Asignación de genotipos putativos mediante el análisis de fusión de alta resolución (HRM)

De las 149 muestras georreferenciadas de *P. punctata*, se realizó el análisis masivo de 131 muestras con el marcador SSR193 y de 113 muestras con el marcador SSR182. Los perfiles de disociación térmica para el marcador SSR478 no fueron considerados polimórficos (datos no incorporados)

Si bien los valores de Tm obtenidos con el marcador SSR193 presentaron una estrecha variación, cercana a 1°C, cumplían con el criterio de ser $\geq 0,5$, por tanto,

los perfiles de disociación térmica permitieron identificar 11 genotipos putativos (Figura 3.5.1).

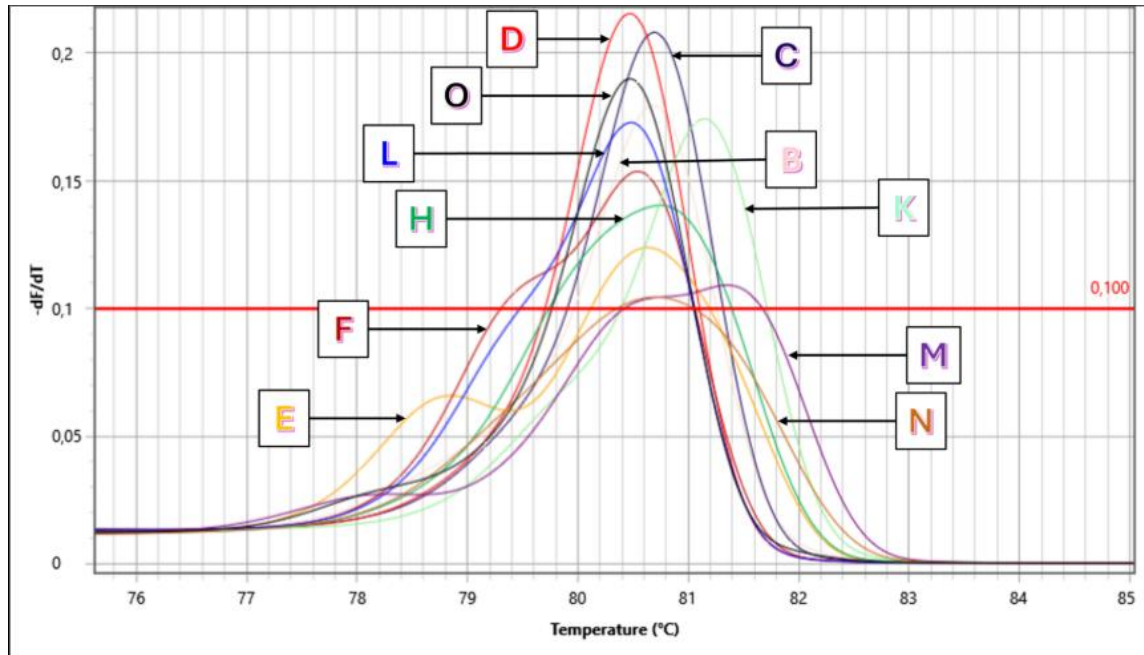


Figura 3.5.1 Curvas de disociación térmica ($-dF/dT$) de los amplicones obtenidos con el marcador SSR193 en muestras de *P. punctata*. Cada curva corresponde a un genotipo putativo distinto. La línea roja indica el umbral de detección

Mientras que los perfiles de fusión de alta resolución (HRM) obtenidos con el gráfico de fluorescencia normalizada reforzaron la presencia de al menos 6 genotipos distintos y bien definidos (Figura 3.5.2) el gráfico de diferencia de fluorescencia (*difference plot*), prestó un mayor poder de discriminación entre los

genotipos putativos, gracias a la resta realizada entre los valores de fluorescencia de una curva central utilizada como referencia (genotipo B) y el resto de las curvas (Figura 3.5.3).

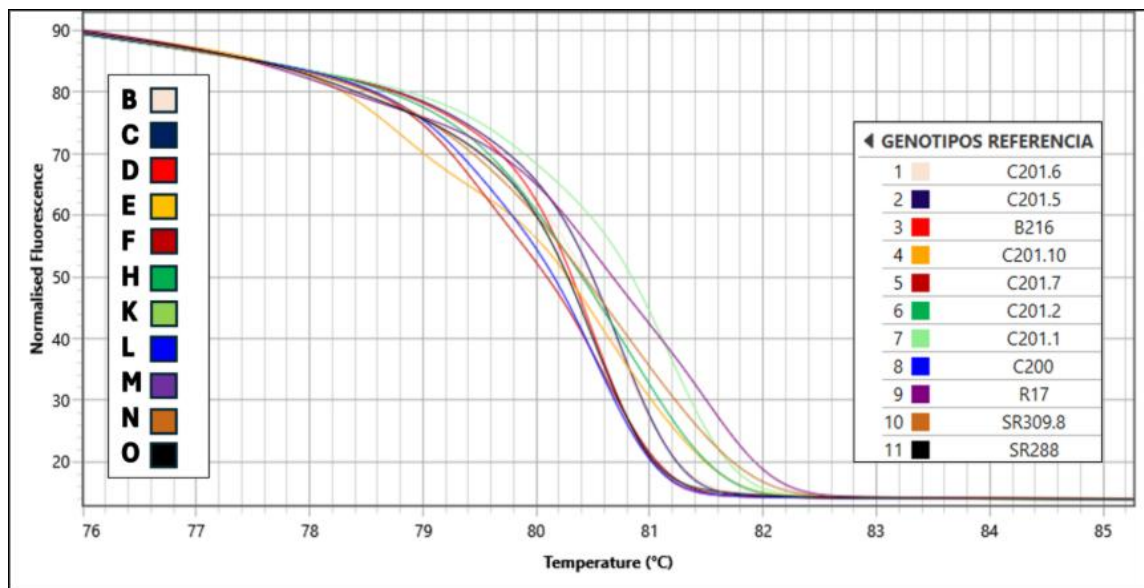


Figura 3.5.2 Perfiles de fusión de alta resolución (HRM) normalizados correspondientes a 11 genotipos putativos de *P. punctata* obtenidos con el marcador SSR193. Cada color representa un genotipo distinto

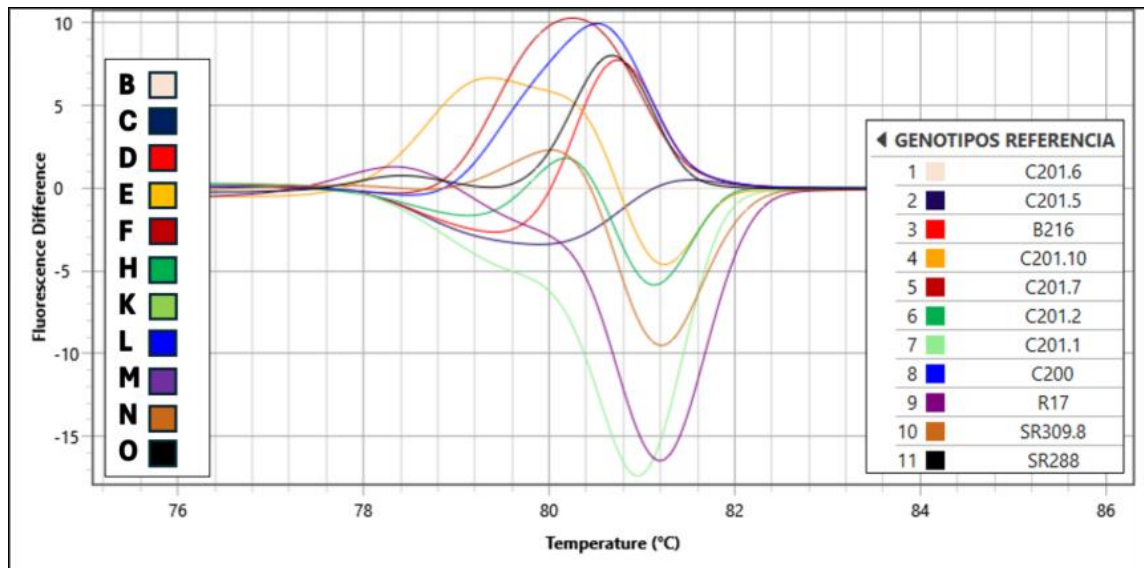


Figura 3.5.3 Gráfico de diferencia de fluorescencia (*difference plot*) entre los perfiles de fusión de alta resolución correspondientes a 11 genotipos putativos de *P. punctata* obtenidos con el marcador SSR193

Los perfiles HRM para el marcador SSR182, permitieron identificar 8 genotipos putativos (3.5.4) en las 113 muestras analizadas. Este resultado, complementado con el *difference plots* proporcionó una discriminación más fina de los genotipos, incluso en aquellos casos donde los perfiles de fusión no mostraban variaciones térmicas tan evidentes (Figuras 3.5.5).

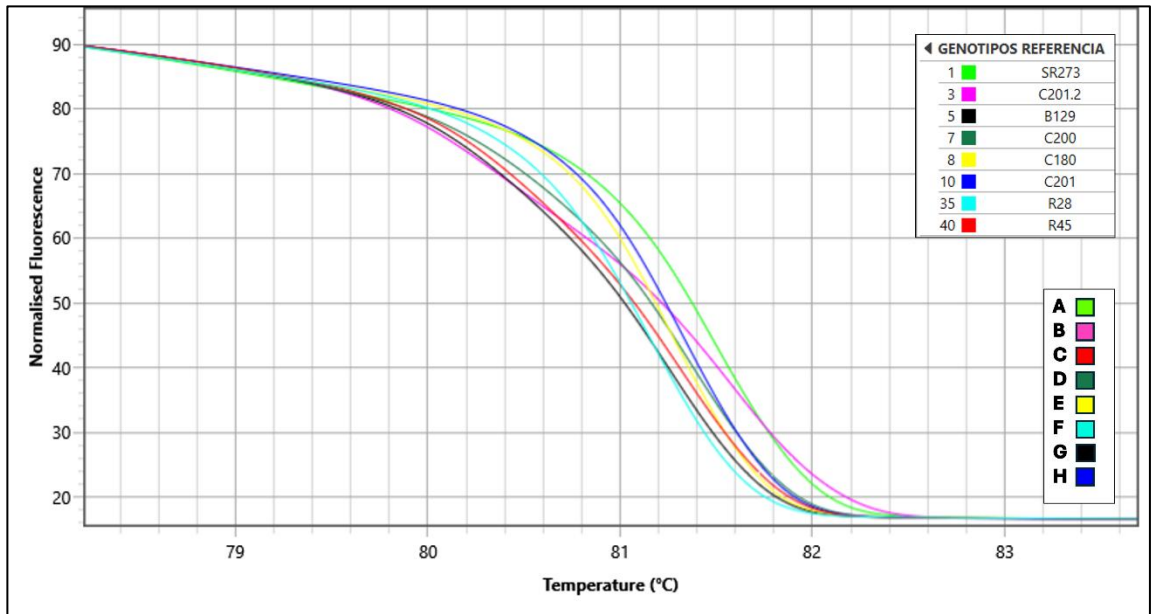


Figura 3.5.4 Perfiles de fusión de alta resolución (HRM) normalizados correspondientes a ocho genotipos putativos de *P. punctata* obtenidos con el marcador SSR182. Cada color representa un genotipo distinto

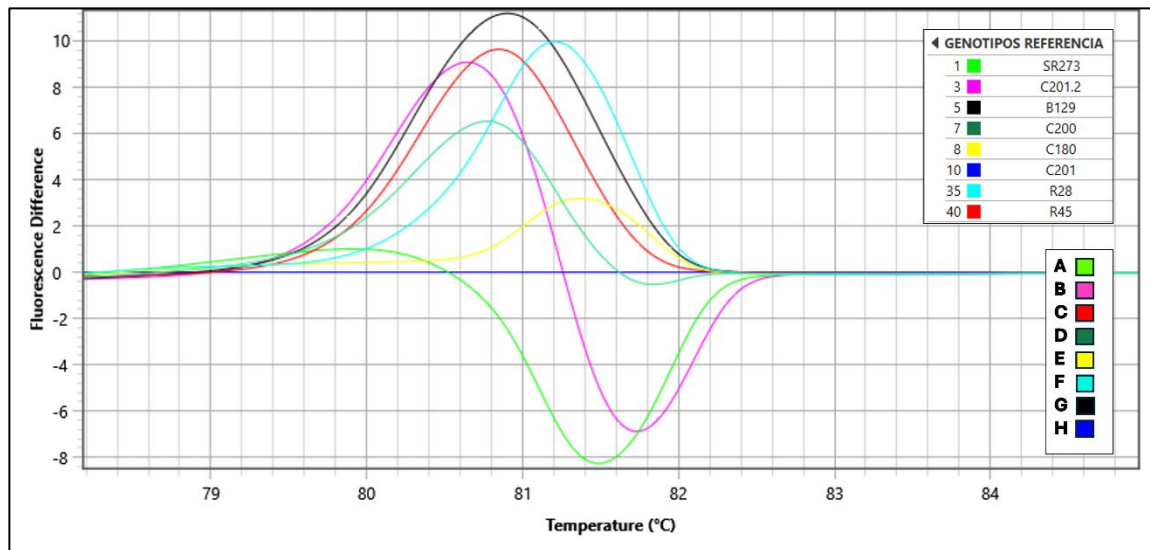


Figura 3.5.5 Gráfico de diferencia de fluorescencia (*difference plot*) entre los perfiles de fusión de alta resolución correspondientes a ocho genotipos putativos de *P. punctata* obtenidos con el marcador SSR182. Cada curva representa un genotipo putativo, respecto a la curva central de referencia (genotipo H)

Cabe señalar que el poder discriminante de este análisis se sustenta en el delta de fluorescencia calculado entre una curva de referencia central y el resto de los perfiles evaluados, permitiendo evidenciar aún más las diferencias entre genotipos (Wittwer et al., 2003). De esta manera, la combinación del análisis de curvas de fusión normalizadas y *difference plots* constituyó una estrategia robusta para la asignación de genotipos putativos mediante HRM en *P. punctata*.

En general, los valores promedio de ciclos de cuantificación (Cq) y temperatura de fusión (Tm) para cada genotipo por población se mantuvieron entre 21 y 25 ciclos y entre 79 y 81 °C, respectivamente (Tabla 3.5.1). Los valores más bajos de Cq (~21–22) sugieren una mayor abundancia de ADN molde y una mayor eficiencia en la amplificación, mientras que valores más altos (>24) podrían indicar una menor cantidad de ADN molde o una menor afinidad del marcador por la secuencia diana. Las diferencias observadas en los valores promedio entre plantas madre e hijas podrían reflejar variaciones en la calidad y/o integridad del ADN extraído. Si bien la degradación del ADN ha sido considerada un problema menor en los ensayos de qPCR en comparación al uso de ARN (Bustin et al., 2009), la procedencia, el grado de contaminación y la concentración del ADN podrían impactar negativamente en el análisis HRM llegando incluso a asignar genotipos de manera errónea (Słomka et al., 2017).

Por otra parte, pese a la estrecha diferencia de valores de Tm para el marcador SSR193, en algunos casos particulares, como el genotipo D en hijas de la población de Colcura con un valor de Tm=79,64 °C, esta sugiere la presencia de variantes alélicas o diferencias en la composición de bases GC de los fragmentos amplificados (Tabla 3.5.1). Por otra parte, los altos valores promedio de confianza en la asignación de genotipos (>97%) respaldan la robustez del método HRM para la genotipificación de microsatélites (SSR) en *P. punctata*. No obstante, el análisis no estuvo exento de excepciones, como en el caso del

genotipo B en la población de Ramadillas (plantas madre), donde el valor promedio de confianza fue 92,73%, lo que sugiere la necesidad de una interpretación más cautelosa de la asignación de este genotipo putativo.

Tabla 3.5.1 Valores promedio de ciclos de cuantificación (Cq), temperatura de fusión (Tm), y porcentaje de confianza en asignación de genotipos por población y genotipo en individuos de madres e hijas de *P. punctata*

Población	Genotipo	N° individuos	Cq promedio	Tm promedio	Confianza promedio	Origen
COLCURA	B	1	22.05	80.74	98.51	Madres
COLCURA	C	3	22.26	80.55	97.95	Madres
COLCURA	E	4	22.74	80.61	98.90	Madres
COLCURA	H	7	21.66	80.61	99.86	Madres
COLCURA	K	3	23.23	81.14	99.51	Madres
COLCURA	L	2	23.18	80.48	100.00	Madres
LOS BARROS	D	21	22.45	80.40	99.15	Madres
LOS BARROS	E	5	22.27	80.63	99.46	Madres
LOS BARROS	K	11	22.88	81.16	99.83	Madres
RAMADILLAS	B	1	21.89	80.74	92.73	Madres
RAMADILLAS	D	2	21.78	80.53	99.11	Madres
RAMADILLAS	K	13	24.22	81.26	98.75	Madres
RAMADILLAS	M	4	25.27	81.32	99.25	Madres
RAMADILLAS	O	4	23.88	80.51	98.03	Madres

Población	Genotipo	N° individuos	Cq promedio	Tm promedio	Confianza promedio	Origen
SAN RAMÓN	D	5	22.52	80.47	99.55	Madres
SAN RAMÓN	E	3	22.61	80.59	99.72	Madres
SAN RAMÓN	K	12	22.68	81.12	99.19	Madres
SAN RAMÓN	O	2	21.52	80.37	99.56	Madres
COLCURA	B	1	23.78	80.69	100.00	Hijas
COLCURA	C	1	19.06	80.72	100.00	Hijas
COLCURA	D	2	23.40	79.64	99.81	Hijas
COLCURA	E	3	21.66	80.12	99.74	Hijas
COLCURA	F	3	21.51	80.46	99.94	Hijas
COLCURA	H	4	21.82	80.70	99.66	Hijas
COLCURA	K	6	21.54	80.82	99.89	Hijas
LOS BARROS	D	20	23.08	79.65	99.34	Hijas
SAN RAMÓN	D	3	23.83	80.39	99.33	Hijas
SAN RAMÓN	H	2	24.01	80.89	99.65	Hijas
SAN RAMÓN	K	14	22.07	81.08	99.69	Hijas
SAN RAMÓN	N	1	25.10	80.77	100.00	Hijas

El análisis HRM del marcador microsatélite SSR193 permitió identificar, en un inicio, 11 genotipos putativos, sin embargo, el filtro posterior de dichos perfiles

redujo el número a 9 genotipos, dejando fuera a los genotipos F y N, por ser considerados similares a los perfiles de los genotipos L y H, respectivamente.

La distribución espacial de estos genotipos evidenció diferencias entre localidades, sugiriendo la presencia de una estructura genética incipiente a escala local (Figura 3.5.6). El genotipo K fue el más ampliamente distribuido, presente en las cuatro localidades estudiadas y con mayor frecuencia en Ramadillas (n = 15) y San Ramón (n = 14), lo que sugiere una mayor representatividad poblacional de este linaje genético. En contraste, el genotipo D mostró un patrón marcadamente localizado, concentrándose casi exclusivamente en la población de Los Barros (n = 30), donde alcanzó su máxima abundancia relativa.

La población de Colcura presentó la mayor diversidad genotípica para el marcador SSR193, con ocho genotipos distintos, aunque con frecuencias individuales bajas (entre 3 y 7 individuos por genotipo). Por su parte, Ramadillas registró siete genotipos, con una distribución más heterogénea, destacando el predominio del genotipo K y la presencia moderada de los genotipos M y O. En cuanto a San Ramón se detectaron cuatro genotipos, nuevamente con predominio de K y frecuencias reducidas para D, E y O, lo que sugiere una menor diversidad relativa en esta localidad.

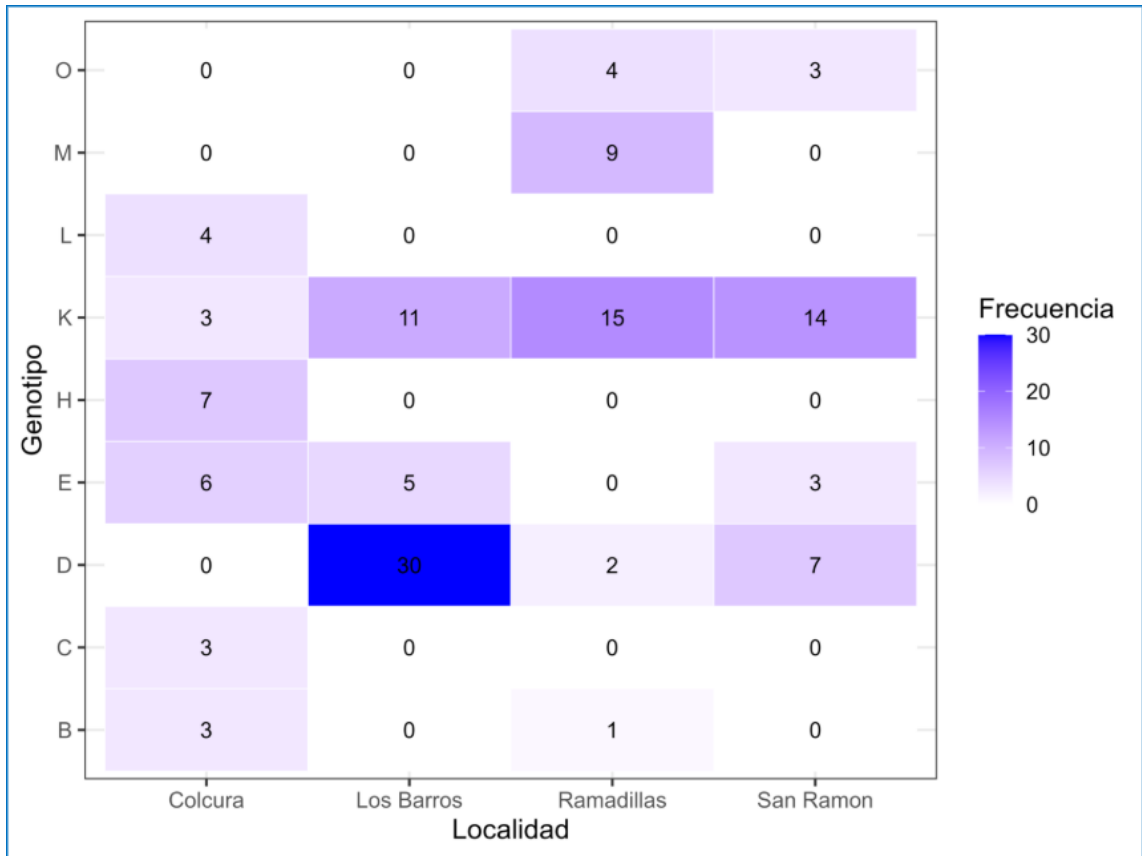


Figura 3.5.6 Distribución de frecuencias de los genotipos detectados mediante el marcador microsatélite SSR193 en cuatro localidades de *P. punctata* (Colcura, Los Barros, Ramadillas y San Ramón)

Si bien la asignación de genotipos putativos mediante HRM permitió revelar patrones consistentes de variación genética intraespecífica en *P. punctata*, la naturaleza indirecta de esta aproximación —basada en diferencias en los perfiles de fusión— hace necesaria una validación molecular directa de los amplicones representativos. En este contexto, la secuenciación de productos PCR asociados

a los distintos genotipos identificados se vuelve un paso clave para confirmar que las diferencias observadas en las curvas HRM corresponden efectivamente a variaciones en la longitud del microsatélite y/o a polimorfismos de secuencia en las regiones flanqueantes. Estudios previos han demostrado que la combinación de SSR-HRM con secuenciación Sanger constituye una estrategia robusta para la validación de genotipos, particularmente en especies no modelo o sin genoma de referencia completo (Moya-Moraga & Pérez-Ruíz, 2022).

3.6. Validación del análisis HRM mediante secuenciación Sanger

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger para los marcadores SSR193 y SSR182 fueron alineadas con sus respectivas secuencias de referencia, observándose una alta concordancia en las regiones flanqueantes del microsatélite y variación estructural en los motivos repetitivos (CTC)⁶ y (TTC)⁷.

En el caso del marcador SSR193, el análisis de los cromatogramas permitió identificar diferencias en el número de repeticiones del motivo (CTC), distinguiéndose dos clases principales de variantes alélicas: genotipos con cinco repeticiones (CTC)⁵ correspondientes a D, L y E, y genotipos con seis repeticiones (CTC)⁶ correspondientes a K, B y C (Figura 3.6.1). El genotipo B fue utilizado como perfil de referencia central en los gráficos de diferencia de fluorescencia. Estas diferencias estructurales fueron consistentes con los perfiles de fusión obtenidos mediante HRM, evidenciando una correspondencia directa entre la temperatura de fusión de los amplicones y la longitud del microsatélite.

Adicionalmente, se detectaron variaciones nucleotídicas en regiones flanqueantes del SSR. En particular, el genotipo K presentó un polimorfismo puntual de tipo SNP aguas arriba del motivo repetitivo (T>G), a su vez el genotipo E presentó una lectura de base ambigua, la cual, de acuerdo con el código de nomenclatura IUPAC, dicho polimorfismo nucleotídico correspondería a un grupo ceto (K), abriendo la posibilidad a una G o T (Johnson, 2010) (Figura 3.6.1). En cuanto a los genotipos D y L, no presentaron diferencias estructurales entre sí en el motivo repetitivo y tampoco en las regiones flanqueantes, sin embargo, fue posible evidenciar una región compleja aguas abajo en el genotipo L, en ambas muestras representativas (C200 y C201.7), cabe mencionar, que entre ambas muestras se evidenció una diferencia en la altura de los picos de lectura, lo cual podría estar asociado a múltiples factores: integridad y pureza del ADN; inhibidores o contaminantes e incluso a factores de corrida (Al-Shuhaib & Hashim, 2023; Crossley et al., 2020; Hiramatsu et al., 2023).

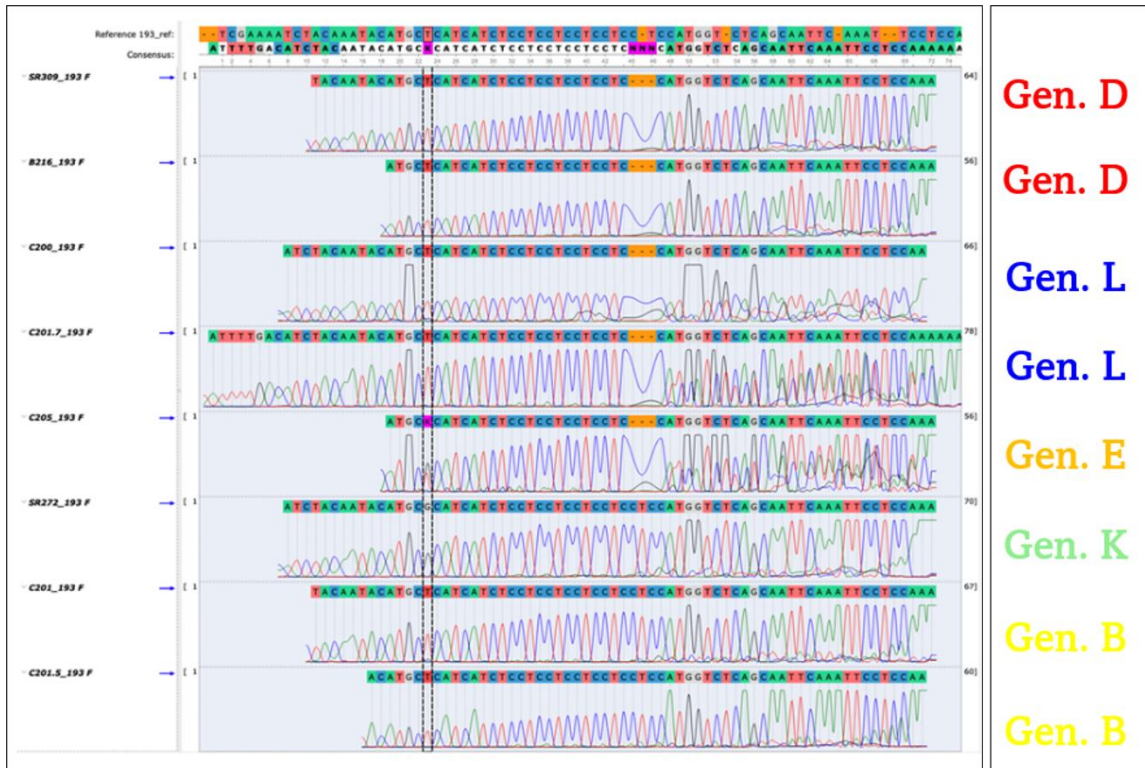


Figura 3.6.1 Alineamiento de secuencias obtenidas por Sanger del marcador SSR193 en *P. punctata*. Se muestran secuencias representativas de los distintos genotipos identificados mediante HRM (D, L, E, K y B). El motivo repetitivo (CTC)⁶ se destaca en la región central del alineamiento

Estos resultados permiten evidenciar que las diferencias en los perfiles HRM no dependen exclusivamente de la longitud del microsatélite, sino también de la composición de bases en regiones adyacentes. Este comportamiento ha sido previamente descrito, donde alelos de igual tamaño pueden diferir en su secuencia debido a variaciones en regiones flanqueantes, contribuyendo al polimorfismo detectado mediante HRM (Distefano et al., 2012).

El alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas para SSR193 confirmó que las diferencias entre genotipos se explican principalmente por variaciones en el número de repeticiones del motivo (CTC), observándose patrones consistentes entre individuos asignados a un mismo genotipo putativo (Figura 3.6.2). No obstante, el resultado de la secuenciación Sanger en este estudio (basada únicamente en lecturas forward) presentó limitaciones para discriminar de manera concluyente la presencia de heterocigosis en los amplicones analizados.

En contraste, los perfiles de fusión obtenidos mediante HRM evidenciaron patrones diferenciales entre genotipos homocigotos y heterocigotos. Mientras que los genotipos homocigotos presentaron curvas de fusión simétricas con un único punto de transición térmica, otros genotipos exhibieron curvas asimétricas o con dos rangos de fusión (“hombros”), sugiriendo la presencia de heterocigosis. Este comportamiento ha sido ampliamente descrito en la literatura, donde los heterocigotos generan heterodúplex que se desnaturalizan a temperaturas más bajas que los homodúplex, produciendo curvas de fusión compuestas características que difieren en forma más que en valores de T_m (Graham et al., 2005; Liew et al., 2004)

La concordancia entre los perfiles HRM (Figura 3.6.3b-d) y los resultados del análisis de fragmentos respalda la capacidad del HRM para detectar variaciones genética en microsatélites, incluso en ausencia de secuenciación bidireccional. Así mismo, los resultados evidencian que la forma de la curva de fusión constituye un parámetro altamente informativo para la discriminación genotípica, especialmente en contextos donde las diferencias en T_m son reducidas.

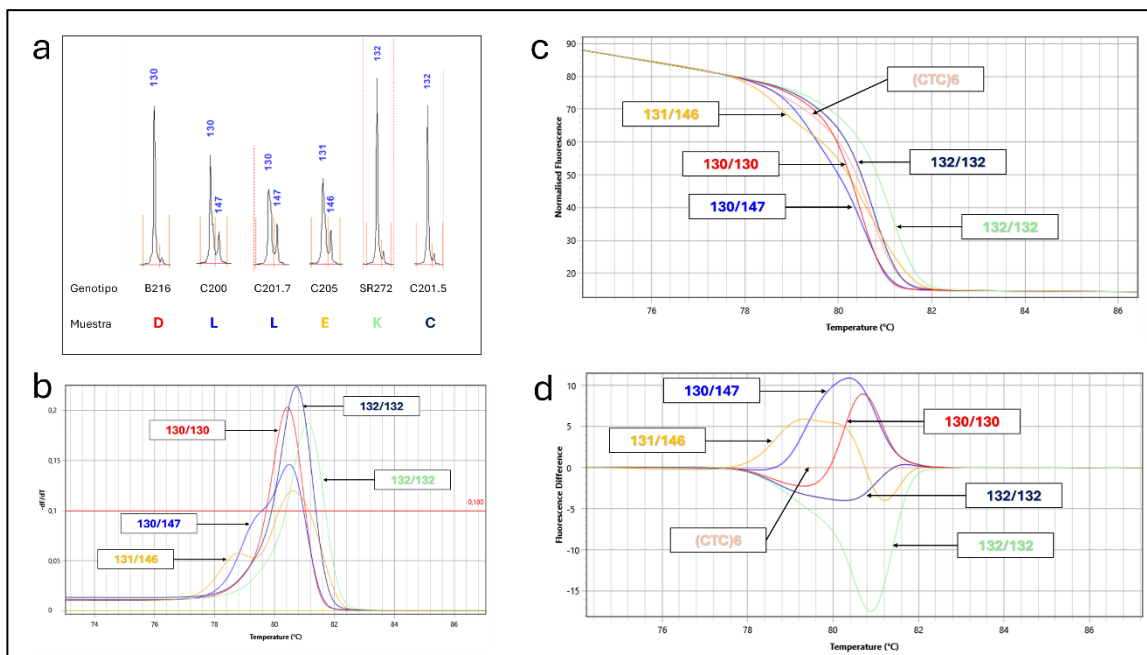


Figura 3.6.3 Comparación entre perfiles de electroforesis capilar y análisis de fusión de alta resolución (HRM) de 5 genotipos analizados con el marcador SSR193 en muestras representativas de *P. punctata*. **(a)** Perfiles de fragmentos fluorescentes analizados con Fragment Analyzer de 5 genotipos diferentes. Se observan 5 alelos distintos (130 pb, 131 pb, 132 pb, 146 pb y 147 pb) formando 3 homocigotos y 2 heterocigotos. **(b)** Curvas de disociación térmica con distintas formas y pequeños desplazamientos de temperatura. **(c)** Gráfico HRM normalizado muestra curvas con uno o más puntos de transición térmica. **(d)**

Sin embargo, es importante considerar que el análisis HRM presenta limitaciones cuando el número de genotipos es elevado, ya que algunos perfiles de fusión pueden resultar similares entre sí, dificultando su discriminación. Este fenómeno ha sido reportado previamente, indicando que, en poblaciones con alta diversidad alélica, la superposición de curvas puede generar asignaciones ambiguas, requiriendo estrategias complementarias como el uso de muestras de referencia o análisis adicionales (Distefano et al., 2012; Ganopoulos et al., 2011). En este estudio, esta limitación fue mitigada mediante el uso de gráficos de diferencia (difference plots), los cuales aumentaron la resolución en la discriminación de genotipos, permitiendo comparar los perfiles de fusión respecto a un genotipo correspondiente a una muestra estándar, tal como ha sido utilizado y descrito en otros sistemas biológicos (Chatzidimopoulos et al., 2014), evitando así técnicas posteriores, como geles de poliacrilamida (PAGE) ampliamente utilizados en estudios intra e interespecíficos (An et al., 2017; Kumar et al., 2015; Ollitrault et al., 2010).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la genotipificación de marcadores microsatélites mediante HRM, complementada con análisis de fragmentos fluorescentes, constituye una estrategia robusta para la detección de variación genética en *P. punctata*. El marcador SSR193 destacó particularmente por su alto poder discriminante, permitiendo identificar múltiples genotipos y evidenciar patrones de variación intraespecífica.

No obstante, el reducido número de marcadores polimórficos limita la capacidad de realizar inferencias poblacionales robustas, por lo que futuros estudios deberán considerar la incorporación de un mayor número de loci informativos. En este sentido, investigaciones en especies nativas como *Gevuina avellana* han demostrado que el uso de un número moderado de marcadores SSR, combinado con técnicas de alta resolución como HRM, permite obtener información relevante para la conservación genética (Moya-Moraga & Pérez-Ruíz, 2022). Aun así, el fortalecimiento de paneles de marcadores sigue siendo un desafío clave para especies en categoría de amenaza.

Finalmente, considerando que *P. punctata* presenta una variabilidad genética relativamente baja (Venegas Díaz, 2015), los resultados obtenidos refuerzan la utilidad de metodologías sensibles como HRM para detectar variación genética en especies no modelo carentes de un genoma totalmente secuenciado, contribuyendo al desarrollo de herramientas moleculares que permitan caracterizar con mayor precisión su estructura genética, apoyando así nuevas estrategias de conservación basadas en evidencias moleculares.

IV. CONCLUSIONES

Se validó el uso de marcadores microsatélites mediante análisis de fusión de alta resolución (HRM) para la discriminación de genotipos en *P. punctata*, cumpliéndose el objetivo general del estudio. El marcador SSR193 destacó por su alto poder discriminante, permitiendo diferenciar múltiples genotipos entre individuos.

Los genotipos obtenidos mediante HRM mostraron concordancia con la variación alélica determinada por análisis de fragmentos fluorescentes, confirmando que las diferencias en los perfiles de fusión reflejan variación genética real, tanto en la longitud del microsatélite como en la secuencia de regiones flanqueantes.

Los resultados obtenidos validan la hipótesis planteada, demostrando que el análisis HRM constituye una herramienta eficaz para la genotipificación de SSRs en *P. punctata*, incluso en contextos de baja variabilidad genética.

El número limitado de marcadores polimórficos restringió la posibilidad de realizar inferencias poblacionales robustas, por lo que los patrones genéticos observados deben considerarse preliminares.

La metodología desarrollada, basada en la integración de HRM y análisis de fragmentos fluorescentes, constituye una herramienta útil para la caracterización genética de *P. punctata* y una base para futuros estudios orientados a la conservación genética de la especie.

V. GLOSARIO

1. ADNg (ADN genómico): Material genético total extraído de un organismo, que incluye regiones codificantes y no codificantes del genoma nuclear.
2. Amplicón: Fragmento de ADN obtenido como producto de una reacción de PCR, correspondiente a la región específica amplificada por un par de cebadores.
3. Cebadores (primers): Oligonucleótidos de secuencia conocida que delimitan la región de ADN a amplificar durante la PCR.
4. Contig: Secuencia continua de ADN ensamblada a partir de fragmentos más pequeños obtenidos por secuenciación o ensamblaje genómico.
5. Cq (Quantification cycle): Ciclo de cuantificación en qPCR que indica el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia supere el umbral de detección, siendo inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN molde.
6. Curva de fusión (melting curve): Representación gráfica de la disminución de fluorescencia de un fluoróforo intercalante conforme aumenta la temperatura y el ADN pasa de doble a simple cadena.
7. ΔT_m (Delta T_m): Diferencia en la temperatura de fusión entre dos amplicones, utilizada como criterio para inferir posibles polimorfismos.

8. Electroforesis en gel: Técnica que permite separar fragmentos de ADN según su tamaño mediante la aplicación de un campo eléctrico en una matriz de agarosa o poliacrilamida.
9. Genotipo: Constitución genética de un individuo en un locus determinado.
10. Genotipo putativo: Clasificación genética inferida a partir de perfiles de fusión HRM, pendiente de confirmación mediante análisis molecular directo.
11. Heterocigoto: Individuo que posee dos alelos diferentes en un locus específico.
12. Homocigoto: Individuo que posee dos alelos idénticos en un locus específico.
13. HRM (High Resolution Melting): Técnica de análisis post-PCR basada en la detección de diferencias en los perfiles de fusión de ADN, utilizada para identificar variaciones genéticas como SNPs, INDELS y polimorfismos en microsatélites.
14. INDEL: Polimorfismo genético caracterizado por la inserción o delección de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN.
15. Locus (plural: loci): Posición específica de un gen o marcador molecular en un cromosoma.
16. Microsatélite (SSR, Simple Sequence Repeat): Secuencia corta de ADN formada por la repetición en tándem de motivos de 1 a 6 pares de bases, altamente polimórfica y utilizada como marcador molecular.

17. Polimorfismo: Presencia de dos o más variantes genéticas en una población para un mismo locus.
18. PCR (Polymerase Chain Reaction): Técnica molecular que permite amplificar de manera exponencial una región específica de ADN.
19. qPCR (quantitative PCR): Variante de la PCR que permite cuantificar el ADN amplificado en tiempo real mediante señales fluorescentes.
20. SNP (Single Nucleotide Polymorphism): Variación genética que consiste en el cambio de un solo nucleótido en una secuencia de ADN.
21. SSR-HRM: Estrategia metodológica que combina marcadores microsatélites con análisis de fusión de alta resolución para la genotipificación de individuos.
22. Secuenciación Sanger: Método de secuenciación de ADN basado en la terminación de cadena, utilizado para determinar con alta precisión la secuencia nucleotídica de fragmentos específicos.
23. Temperatura de fusión (T_m): Temperatura a la cual el 50% del ADN de doble cadena se encuentra desnaturalizado, dependiendo de la longitud, composición GC y secuencia del amplicón.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shuhaib, M. B. S., & Hashim, H. O. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 115.
- An, J., Yin, M., Zhang, Q., Gong, D., Jia, X., Guan, Y., & Hu, J. (2017). Genome Survey Sequencing of *Luffa Cylindrica* L. and Microsatellite High Resolution Melting (SSR-HRM) Analysis for Genetic Relationship of *Luffa* Genotypes. *Int J Mol Sci*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091942>
- Arthofer, W., Steiner, F. M., & Schlick-Steiner, B. C. (2011). Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis. *Molecular genetics and genomics*, 286(3), 225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S00438-011-0641-0>
- Barrias, S., Ibanez, J., & Martins-Lopes, P. (2024). High resolution melting analysis of microsatellite markers applied to grapevine varietal fingerprinting throughout the wine production chain. *Food Control*, 160, 110368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110368>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chatzidimopoulos, M., Ganopoulos, I., Vellios, E., Madesis, P., Tsaftaris, A., & Pappas, A. C. (2014). Development of a two-step high-resolution melting (HRM) analysis for screening sequence variants associated with resistance to the Qols, benzimidazoles and dicarboximides in airborne inoculum of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett*, 360(2), 126-131. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12594>

- Chatzidimopoulos, M., Zambounis, A., Lioliopoulou, F., & Vellios, E. (2022). Detection of *Venturia inaequalis* Isolates with Multiple Resistance in Greece. *Microorganisms*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10122354>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767-775.
- Distefano, G., Caruso, M., La Malfa, S., Gentile, A., & Wu, S. B. (2012). High resolution melting analysis is a more sensitive and effective alternative to gel-based platforms in analysis of SSR--an example in citrus. *PLoS One*, 7(8), e44202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044202>
- Ebili, H., & Ilyas, M. (2015). High resolution melt analysis, DNA template quantity disparities and result reliability. *Clinical Laboratory*, 61(1-2), 155-159.
<https://doi.org/https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2014.140821>
- Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2011). Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control*, 22(3-4), 532-541.
- García-Valencia, L. E., Pérez-García, J., Vallejo-Reyna, M. Á., Reynoso-Santos, R., Vargas-Hernández, J., & García-Campusano, F. (2022). cpSSR and High-Resolution Melting Analysis (HRM) for *Pinus pseudostrobus* Lindl. Variety Genotyping and Discrimination. *Forests*, 13(2), 200.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/f13020200>
- Gomes, S., Breia, R., Carvalho, T., Carnide, V., & Martins-Lopes, P. (2018). Microsatellite High-Resolution Melting (SSR-HRM) to Track Olive Genotypes: From Field to Olive Oil. *J Food Sci*, 83(10), 2415-2423.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14333>

- 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>
- Hiramatsu, K., Matsuda, C., Masago, K., Toriyama, K., Sasaki, E., Fujita, Y., Haneda, M., Ebi, H., Shibata, N., & Hosoda, W. (2023). Diagnostic utility of DNA integrity number as an indicator of sufficient DNA quality in next-generation sequencing–based genomic profiling. *American Journal of Clinical Pathology*, 160(3), 261-267.
- Jiang, E., Zhang, S., & Pang, H. (2020). Genotyping genetic markers from LCN and degraded DNA by HRM and their application in hair shaft. *International Journal of Legal Medicine*, 134(1), 31-37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S00414-019-02045-W>
- Johnson, A. D. (2010). An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics*, 26(10), 1386-1389.
- Kumar, M., Kim, S. R., Sharma, P. C., & Pareek, A. (2015). Simple and efficient way to detect small polymorphic bands in plants. *Genom Data*, 5, 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.06.006>
- Le Quesne, C., & Medina, R. (1998). Germinación y viverización de *Pitavia punctata* Mol., Rutaceae endémica de Chile en estado crítico de conservación. *Bosque*, 19(1), 101-110.
- Li, J., Xiong, C., He, X., Lu, Z., Zhang, X., Chen, X., & Sun, W. (2018). Using SSR-HRM to Identify Closely Related Species in Herbal Medicine Products: A Case Study on Licorice. *Front Pharmacol*, 9, 407. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00407>
- 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.

- Lombal, A. J., Wenner, T. J., & Burridge, C. P. (2015). Assessment of high-resolution melting (HRM) profiles as predictors of microsatellite variation: an example in Providence Petrel (*Pterodroma solandri*). *Genes & Genomics*, 37(12), 977-983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S13258-015-0327-9>
- Mackay, J. F., Wright, C. D., & Bonfiglioli, R. G. (2008). A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*, 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-8>
- Mader, E., Lukas, B., & Novak, J. (2008). A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC genetics*, 9(1), 69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-69>
- Moya-Moraga, M. R., & Pérez-Ruíz, C. (2022). Application of MaxEnt modeling and HRM analysis to support the conservation and domestication of Gevuina avellana Mol. In Central Chile. *Plants*, 11(20), 2803.
- Muñoz Gómez, R. A. (1991). Caracterización del habitat de *Pitavia punctata* (R. et P.) Mol., a través de su distribución geográfica y algunos antecedentes de su reproducción sexual y asexual.
- Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M., & Ollitrault, P. (2010). Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in *Citrus*. *Am J Bot*, 97(11), e124-129. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000280>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1), 62-66.
- Ricchi, M., Barbieri, G., Cammi, G., Garbarino, C. A., & Arrigoni, N. (2011). High-resolution melting for analysis of short sequence repeats in *Mycobacterium*

- avium subsp. paratuberculosis. *FEMS microbiology letters*, 323(2), 151-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02371>.
- Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping—Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2316. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms18112316>
- Venegas Díaz, C. F. (2015). Variabilidad genética en sub-poblaciones de *Pitavia punctata* Mol. especie endémica amenazada del Centro-Sur de Chile.
- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical chemistry*, 49(6), 853-860.
- Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Koubouris, G., Tsaftaris, A., Sergendani, C., Kalivas, A., & Madesis, P. (2014). Microsatellite high-resolution melting (SSR-HRM) analysis for genotyping and molecular characterization of an *Olea europaea* germplasm collection. *Plant Genetic Resources*, 12(3), 273-277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S147926211400001X>
- Xu, X., Wang, N., Feng, L., & Wang, J. (2023). Simple Sequence Repeat Fingerprint Identification of Essential-Oil-Bearing *Rosa rugosa* via High-Resolution Melting (HRM) Analysis. *Biomolecules*, 13(10), 1468. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom13101468>

VII. Apéndice

Apéndice 1. Protocolo de extracción de ADN genómico DNeasy Mini Spin QUIAGEN

1. Añadir 600 uL de buffer de lisis AP1-SDS con 8% de PVP precalentado a 65°C más 2 uL de RNAsa de QUIAGEN a tubo de homogeneización con dos esferas de cerámica y 0,06 mg \pm 0,005 de material vegetal trozado en pequeños pedazos.
2. Incubar a 65°C por 5 minutos.
3. Homogeneizar a 1500 rpm por 1 minuto (2 veces). Se debe moler más del 50% del tejido vegetal.
4. Incubar nuevamente a 65°C por 10 minutos
5. Para precipitar contaminantes y acidificar el medio añadir 200 uL de buffer AP2, mezclar con vortex por 10 segundos.
6. Incubar por 10 minutos a -20°C. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
7. Transferir fase líquida a una columna QIAshedder Mni Spin y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
8. Transferir el eluato obtenido a un tubo eppendorf de 1,5 ml y agregar 1,5 volúmenes de buffer AP3, el cual contiene guanidina HCL, una sal caotrópica que facilita la adsorción del ADN a la columna de sílica.
9. Transferir la solución anterior a una columna DNeasy Mini Spin y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, eliminar el eluato.
10. Agregar 500 uL de tampón AW para eliminar sales y proteínas residuales y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Repetir este paso.
11. Centrifugar sin buffer AW a 13000 rpm por 2 minutos.
12. Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1,5 ml y añadir 100 uL de buffer LowTE precalentado a 70°C para eluir el ADN de la columna de sílice e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
13. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto y almacenar muestra de ADN a -20°C hasta su utilización.

Apéndice 2. Partidores flanqueantes de marcadores SSRs para *P. punctata*

N°	Nombre	Motivo	Partidor directo (5' - 3')	Partidor reverso (5' - 3')	Tamaño de amplicón
1	SSR_Pp_165084	(CTG) ₆	ATAGGAAGGAGCTTCAGTTTC	TAGCTACATTGCAAAAATCCG	174
2	SSR_Pp_161521	(GAA) ₅	GCAAGTTTTGGTGAAATGTTG	GGAGGTTACATGACAAGGTAA	197
3	SSR_Pp_196880	(TCA) ₆	ACTCATGATCATACCCAGTTG	CGATCATTCTTTAGCCACAAG	215
4	SSR_Pp_198283	(CCA) ₅	TGATGTCAGATCTGGTTCAAA	CTATGTACACAAACACCTCT	245
5	SSR_Pp_22065	(TTA) ₅	TGTTCTGTATTCACATTGGGA	CAAACCTTGCAATAACCTCTT	280
6	SSR_Pp_87488	(AAT) ₇	CACATAGGTGAAAGGAGATT	ATGTCTTGCAGCAATACTAGT	180
7	SSR_Pp_115424	(CTG) ₆	CTCACTTTGGCTATGCAAATT	AGAAGAGAAATAAGCAGGGTC	255
8	SSR_Pp_197608	(AAT) ₉	TCTTCAAAGTCCTTAAACCCA	ACACAACCTTTAGAATCCTCA	181
9	SSR_Pp_115426	(CTG) ₆	GTCGTCATTTTTGTGGATTCA	GAGAAGAGAAATAAGCAGGGT	212
10	SSR_Pp_150579	(CCA) ₅	CTCTTCTTCTCTTACAGCAA	TCCTAACAGTTCTGGGAGG	183
11	SSR_Pp_97934	(CAA) ₆	TCAAGCGTCATTATCATTATCA	TAATCAACACCATCCCATTGA	210
12	SSR_Pp_242925	(TAT) ₅	AATCCTTCAAATGTTGGACG	AATCGCAACACAATAAGGAAC	179
13	SSR_Pp_174193	(CTC) ₆	ACTAGCAAAAAGTCGAGTGTA	TTGGAGGAATTTGAATTGCTG	128
14	SSR_Pp_130736	(CTC) ₆	TCTCCAAAAAGTCCCTAGTA	GAACAACCACGAACAAAAAGA	279
15	SSR_Pp_15478	(AAT) ₇	AACCAAGTTCTTATCATTGGC	AGAATATGTTTGGTGGTGTGA	133
16	SSR_Pp_79182	(TTC) ₇	CCGAACACTCATCAACTTAAC	GTTGAAACTGAGCCAATTGAT	236
17	SSR_Pp_56358	(ATT) ₅	TTCTTCCTTTCTTCGTCTCTC	GCTCAGAAATAAGCTCCCTAA	202
18	SSR_Pp_116214	(CAG) ₇	AGTGGCACAATCAATCTTCTA	ACTTAAGATCAACACTAGCCC	192
19	SSR_Pp_174194	(CTC) ₆	GGTTACCGTAAGTTAAAGCAC	GGTTACCGTAAGTTAAAGCAC	263
20	SSR_Pp_242073	(TAA) ₅	AGCAATAGGAATACCCCTAGA	TCGGGAAACATTTATCGATCA	251
21	SSR_Pp_42365	(ATT) ₈	ACATCAACCCTCTTCAATT	ATTGGATGCGTTGAAATTGAA	257
22	SSR_Pp_89001	(TGA) ₅	AACCAGAAGATGAAGAGGATG	GTAATAACTGCGCTACCAAAG	219

Apéndice 3. Muestras representativas de producto PCR de *P. punctata* seleccionadas para secuenciación Sanger

N° de reacciones	Nombre de la muestra	Nombre del partidor	Tamaño producto de PCR (pb)	Concentración producto (ng/ul)
1	C201	193 F	128 pb	-
1	C201	193 R		-
1	C201.5	193 F	128 pb	-
1	C201.5	193 R		-
1	B216	193 F	128 pb	-
1	B216	193 R		-
1	B149	193 F	128 pb	-
1	B149	193 R		-
1	SR309	193 F	128 pb	-
1	SR309	193 R		-
1	C201.3	193 F	128 pb	-
1	C201.3	193 R		-
1	C205	193 F	128 pb	-
1	C205	193 R		-
1	C201.7	193 F	128 pb	-
1	C201.7	193 R		-
1	C201.2	193 F	128 pb	-
1	C201.2	193 R		-
1	SR272	193 F	128 pb	-
1	SR272	193 R		-
1	C200	193 F	128 pb	-
1	C200	193 R		-
1	R17	193 F	128 pb	-
1	R17	193 R		-
1	R336	193 F	128 pb	-
1	R336	193 R		-
1	SR309.8	193 F	128 pb	-
1	SR309.8	193 R		-
1	C201.2	182 F	236 pb	-
1	C201.2	182 R		-
1	B216	182 F	236 pb	-
1	B216	182 R		-

1	C201	182 F	236 pb	-
1	C201	182 R		-
1	B149	182 F	236 pb	-
1	B149	182 R		-
1	B216	478 F	133 pb	-
1	B216	478 R		-
1	B217	478 F	133 pb	-
1	B217	478 R		-
1	C201.2	478 F	133 pb	-
1	C201.2	478 R		-
1	B149	478 F	133 pb	-
1	B149	478 R		-

VIII. Anexos

Anexo 1. Rúbrica utilizada en el proyecto FONDECYT 002/2022 para la estimación del grado de alteración del hábitat de *P. punctata*

N°	Aspecto a evaluar en cada sitio	ALTO (3)	MEDIO (2)	BAJO (1)
1	Tamaño del sitio (lugar con pitaos).	Pequeño (menos de 10m en su menor longitud).	Mediano (entre 10 y 100 m en su menor longitud).	Gran tamaño (más de 1 ha, mínimo 100 m en su menor longitud).
2	Signos de fuego en el sitio o su entorno.	Árboles de pitaos con signos de fuego. Además, entorno del sitio con árboles quemados recientemente (< 5 años).	Árboles de pitaos sin signos de fuego. Además, entorno del sitio con árboles quemados recientemente (< 5 años).	Árboles de pitaos sin signos de fuego. Además, entorno del sitio con árboles sin signos de fuego o con signos > 5 años.
3	Fecas de ganado.	Abundante presencia de fecas de ganado.	Poca presencia de fecas de ganado.	No hay fecas de ganado.
4	Huellas de ganado.	Abundantes pisadas de ganado en el sector.	Pocas pisadas de ganado en el sector.	No hay pisadas de ganado en el sector.
5	Caminos de animales entre la vegetación.	Caminos claros y abundantes por donde el ganado pasa.	Pocos caminos, no muy evidentes.	Ningún signo de paso de ganado en el sector.
6	Vegetación ramoneada por ganado.	Signos claros y abundantes de ramoneo por el ganado.	Escasos signos de ramoneo por el ganado.	No hay signos de ramoneo por el ganado.
7	Densidad de exóticas forestales en el sitio.	Alta densidad, muy numerosas (>1 por 10 m ²), o >70% cobertura	Escasas, <1 por 10 m ² , o <70% cobertura	No hay especies exóticas en el sitio.
8	Altura de exóticas forestales en el sitio.	Gran altura, sobre 10 m.	Mediana altura (2-10 m).	Menos de 2 m o no hay exóticas.
9	Altura de exóticas forestales en el entorno.	Gran altura, sobre 10 m.	Mediana altura (2-10 m).	Menos de 2 m o no hay exóticas.
10	Densidad de quila en el sitio.	Alta densidad (>70% de la superficie).	Mediana densidad (30-70%).	Baja densidad (menos del 30% de la superficie).
11	Densidad de invasivas en el sitio (Teline, Rubus).	Alta densidad (>70% de la superficie).	Mediana o baja densidad (<70%).	No hay invasivas en el sitio.
12	Cercanía a casas rurales.	Sitio a menos de 2 km de casas.	Sitio a 2-10 km de casas.	Sitio a más de 10 km de casas.
13	Cercanía a asentamiento (cientos de habitantes).	Sitio a menos de 2 km de centro poblado.	Sitio a 2-10 km de centro poblado.	Sitio a más de 10 km de centro poblado.
14	Facilidad de acceso desde camino de vehículos.	Cercano, menos de 50 m. Acceso fácil.	A media distancia (50-200 m), o con dificultad media de acceso (pendiente, arbustos, ramas).	Distancia mayor a 200 m, o gran dificultad de acceso (alta pendiente, vegetación o ramas abundantes y densas).
15	Presencia de basura en el sitio.	Basura claramente visible, en varios puntos dentro del sitio.	Algunas basuras presentes.	Muy escasa o sin basura.
16	Movimientos de tierra o construcción.	Movimiento evidente (camino, explanada, construcción) a menos de 50 m.	Movimiento a 50-500 m de distancia.	Movimiento de tierra a más de 500 m del sitio con pitaos.
17	Presencia de árboles nativos maduros.	Árboles nativos de diámetros bajos (ej: roble de menos de 30 cm).	Árboles nativos de diámetros medios (ej: roble 30-50 cm).	Árboles nativos de gran diámetro (ej: roble > 50 cm).
18	Signos de despeje o corta de vegetación nativa en el sitio o entorno.	Signos evidentes y abundantes de despeje o corte de vegetación en el sitio.	Signos escasos en el sitio o frecuentes en el entorno.	No hay signos de despeje o corte de vegetación en el sitio ni entorno.
19	Extracción de madera nativa en el sitio o entorno.	Signos evidentes y abundantes de corte de madera en el sitio.	Signos escasos en el sitio o frecuentes en el entorno.	No hay signos de extracción de madera en el sitio ni entorno.

Anexo 2. Ponderaciones asignadas a cada grupo de factores de alteración ya cada aspecto individual, para el cálculo del índice de alteración del hábitat de *P. punctata* (FONDECYT 002/2022)

N°	Aspecto a evaluar en cada sitio	Factores involucrados	Ponderación grupal	Ponderación individual
1	Tamaño del sitio (lugar con pitao).	indirecto, varios, fragilidad del sitio	2	1
2	Signos de fuego en el sitio o su entorno.	daño por fuego	5	1
3	Fecas de ganado.	ramoneo de follaje y pisoteo de plantulas por ganado	2	3
4	Huellas de ganado.			3
5	Caminos de animales entre la vegetación.			1
6	Vegetación ramoneada por ganado.			5
7	Densidad de exóticas forestales en el sitio.	sombreamiento por exóticas o quila postalteración	5	5
8	Altura de exóticas forestales en el sitio.			5
9	Altura de exóticas forestales en el entorno.			1
10	Densidad de quila en el sitio.			3
11	Densidad de invasivas en el sitio (Teline, Rubus).			5
12	Cercanía a casas rurales.	indicadores indirectos de acceso de personas que pueden dañar	5	3
13	Cercanía a asentamiento (cientos de habitantes).			5
14	Facilidad de acceso desde camino de vehículos.			3
15	Presencia de basura en el sitio.			1
16	Movimientos de tierra o construcción.	alteración de la vegetación.	3	5
17	Presencia de árboles nativos maduros.			1
18	Signos de despeje o corta de vegetación nativa en el sitio o entorno.			5
19	Extracción de madera nativa en el sitio o entorno.			5

Anexo 3. Índice de alteración del hábitat, calculado para 13 localidades con *P. punctata*, de las cuales cuatro fueron evaluadas en este estudio

