



DESARROLLO DE NUEVOS *LOCI* DE MICROSATÉLITES PARA *GEOFFROEA DECORTICANS* (GILLIES EX HOOK. & ARN.) BURKART

DEVELOPMENT OF NEW MICROSATELLITE *LOCI* FOR *GEOFFROEA DECORTICANS* (GILLIES EX HOOK. & ARN.) BURKART

Roberto Contreras^{1*}, Felipe Carevic², Mariana Arias Aburto¹,
Wilson Huanca-Mamani³ y Bladimir Díaz-Martin¹

SUMMARY

1. Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama (CRIDESAT), Universidad de Atacama, Copayapu 485, Copiapó, Chile.

2. Laboratorio de Ecología Vegetal, Facultad de Recursos Naturales Renovables. Universidad Arturo Prat, Campus Huayquique, Iquique, Chile.

3. Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

*roberto.contreras@uda.cl

Citar este artículo

CONTRERAS, R., F. CAREVIC, M. ARIAS ABURTO, W. HUANCA-MAMANI & B.R. DÍAZ-MARTIN. 2021. Desarrollo de nuevos *loci* de microsatélites para *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 56: 533-545.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v56.n4.32721>

Recibido: 12 Abr 2021
Aceptado: 13 Oct 2021
Publicado impreso: 20 Dic 2021
Editora: Viviana Solis Neffa 

ISSN versión impresa 0373-580X
ISSN versión on-line 1851-2372

Background and aims: One of the few tree species adapted to the ecologically limiting conditions of the Atacama Desert is *Geoffroea decorticans*, known as chañar. It is a valuable multipurpose resource used as a food and medicinal product. However, for the purpose of genetic studies, codominant DNA markers specific for this species have not yet been developed. The objective of this work is to develop and validate microsatellite markers (SSR) for *G. decorticans*, in order to perform future studies of genetic diversity and genetic structure of populations.

M&M: SSR markers were searched in the *G. decorticans* genome using the Next-Generation Sequencing (NGS) method, and they were validated through thirty individuals distributed in different localities in northern Chile.

Results: A total of ~ 144,117 microsatellite loci were identified and a set of 41 primer pairs was used for validation. The amplified fragments ranged from 106 bp to 225 bp, the number of alleles ranged from 2 to 9, and the PIC value of the 41 SSR loci ranged between 0.32 and 0.86, with an average of 0.64.

Conclusions: For the first time, putative neutral SSR markers specific to the *G. decorticans* species have been developed in order to promote genetic studies for the conservation of the species. The present study provides a set of 38 new polymorphic SSR markers, which could serve as an effective tool to estimate genetic diversity, genetic structure and to be used in breeding programs.

Keywords

Atacama desert, genetic diversity, *Geoffroea decorticans*, next-generation sequencing, SSR markers.

RESUMEN

Introducción y objetivos: Una de las pocas especies de árboles adaptados a las condiciones ecológicamente limitantes del desierto de Atacama es *Geoffroea decorticans*, conocido como chañar. Es un valioso recurso multipropósito utilizado como alimento y producto medicinal. Sin embargo, aún no se han desarrollado marcadores de ADN codominantes específicos para esta especie que permitan realizar estudios genéticos en la especie. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar marcadores microsatélites (SSR) para *G. decorticans*, con el fin de analizar en el futuro su diversidad genética y estructura genética poblacional.

M&M: Se buscaron marcadores SSR en el genoma de *G. decorticans* a partir del método Next-Generation Sequencing (NGS), y se validaron a través de treinta individuos distribuidos en diferentes localidades del norte de Chile.

Resultados: Se identificó un total de ~144.117 loci de microsatélites y de ellos se usó un grupo de 41 pares de cebadores para la validación. Los fragmentos amplificados variaron de 106 pb a 225 pb, el número de alelos varió de 2 a 9, y el valor PIC de los 41 loci SSR osciló entre 0,32 y 0,86, con un promedio de 0,64.

Conclusiones: Por primera vez se desarrollaron marcadores SSR putativamente neutros específicos de la especie *G. decorticans* con el fin de promover estudios genéticos para la conservación de la especie. El presente estudio provee 38 nuevos marcadores SSR polimórficos, los cuales podrían servir como una herramienta efectiva para estimar la diversidad genética, estructura genética y para ser empleados en programas de mejora.

PALABRAS CLAVES

Desierto de Atacama, diversidad genética, *Geoffroea decorticans*, marcadores SSR, next-generation sequencing.

INTRODUCCIÓN

El desierto de Atacama del norte de Chile, es uno de los desiertos más áridos del planeta, producto de la subsidencia del anticiclón subtropical, el cual es influenciado por la Corriente de Humboldt, la distancia del Atlántico, y el efecto del cordón de los Andes (Ritter *et al.*, 2019). Recientemente, debido al cambio climático, las plantas provenientes de zonas desérticas cobran aún más relevancia, debido a que están adaptadas a entornos hostiles y con capacidad de tolerancia al estrés abiótico (Jiménez *et al.*, 2017). En Chile, una de las pocas especies de árboles nativos adaptadas a las condiciones ecológicamente limitantes del desierto de Atacama es *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (Fabaceae), comúnmente conocido como chañar (Contreras *et al.*, 2018). En Argentina, el chañar está distribuido en diversas provincias, como Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Río Negro, La Pampa, Mendoza, San Juan, San Luis, Tucumán y Santa Fe, entre otras (Ireland & Pennigton, 1999).

El género *Geoffroea* Jacq. pertenece a la familia Fabaceae, y consta de cuatro especies aceptadas: *Geoffroea horsfieldii* (Lesch.) Oken, *Geoffroea spinosa* Jacq., *Geoffroea violacea* (Aubl.) Pers. y *Geoffroea decorticans* (Hook. & Arn.) Burkart y de ocho especies cuyo status taxonómico está aún sin resolver (Plant List, 2021). Por otro lado, se han observado diferencias intraespecíficas dentro de *G. decorticans*. Así, Lamarque *et al.* (2009), a través de un estudio del perfil electroforético de proteínas de semillas de *G. decorticans*, observaron grandes diferencias entre las variantes *G. decorticans* var. *decorticans* y var. *subtropicalis*, aclarando que estas variedades están menos relacionadas de lo que se creía, y sugirió la necesidad de estudiar más individuos en distintas regiones para confirmar su taxonomía.

De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), a nivel mundial esta especie está clasificada como Preocupación Menor (Groom, 2012); mientras que en Chile la comisión de clasificación de especies del Ministerio de Medio Ambiente (17° proceso 2020-2021) la propuso como Vulnerable (MMA, 2021). *Geoffroea decorticans* es un recurso multipropósito utilizado para la alimentación, construcción de artefactos, muebles y viviendas

(Giménez, 2004; Núñez *et al.*, 2009; Castro, 2020; Ugalde *et al.*, 2020). Los frutos de *G. decorticans*, pueden consumirse frescos y/o secos, o también ser utilizados para la elaboración de harina, bebidas alcohólicas y arrope, siendo este último producto un excelente jarabe para el tratamiento de la tos, además, la corteza, hojas y flores tienen propiedades medicinales como expectorantes (Costamagna *et al.*, 2013; Echeverría *et al.*, 2020). Por otro lado, las semillas poseen actividad anticoagulante e hipoglucemiante, presentando inhibidores de serina proteasa, los cuales son los más potentes aislados desde una fuente vegetal (Cotabarren *et al.*, 2020). Además, las semillas de *G. decorticans* poseen propiedades nutritivas, constituyendo una buena fuente de nutrientes esenciales, como proteínas, carbohidratos y lípidos (Maestri *et al.*, 2001; Cittadini *et al.*, 2021). Actualmente en Chile, la valorización del arrope y harina de chañar como Producto Forestal No Maderero, se vincula directamente a las comunidades indígenas, siendo reconocido como un recurso patrimonial local (Varela *et al.*, 2019).

Para conservar los recursos genéticos de esta especie, es necesario realizar más estudios de sus poblaciones, sin embargo, lamentablemente hoy existen pocos trabajos focalizados en determinar su diversidad y variabilidad genética. En este contexto, los microsatélites SSR (simple sequence repeat), son una buena alternativa como marcador codominante para realizar estudios de diversidad y estructura genética, debido a que exhiben una alta tasa de polimorfismo, son útiles para identificar hibridación, análisis de flujo génico y estudios de parentesco y mapeo genético (Vieira *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2019, 2020a, 2020b). De acuerdo a Fox *et al.* (2019) en 2018 se publicaron aproximadamente 2.000 nuevos paneles de marcadores de microsatélites, sugiriendo que los microsatélites continúan siendo populares, y se vislumbra que seguirán utilizándose ampliamente en el futuro en estudios de conservación y ecología.

Los primeros microsatélites desarrollados en el género *Geoffroea*, fueron realizados en la especie *G. spinosa*, para caracterizar poblaciones de Perú, Argentina y Paraguay gracias a 10 loci SSR polimórficos (Naciri-Graven *et al.*, 2005). Luego, usando 6 de estos microsatélites, un estudio profundizó la caracterización de la diversidad genética y diferenciación de poblaciones de *G.*

spinosa de la parte continental de Perú y las Islas Galápagos, revelando diferencias significativas entre las dos regiones geográficas (Caetano *et al.*, 2012). Además, cinco de estos diez microsatélites polimórficos, descritos por Naciri-Graven *et al.* (2005), fueron transferibles a la especie *G. decorticans*, permitiendo realizar los primeros estudios genéticos de poblaciones de chañar establecidas en el Desierto de Atacama (Contreras *et al.*, 2019). Sin embargo, creemos que es necesario desarrollar más marcadores SSR con el fin de dar más soporte a los análisis genéticos de poblaciones de *G. decorticans*. Para ello, se buscó identificar nuevos marcadores de ADN de tipo microsatélites mediante secuenciación NGS. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar marcadores SSR para *G. decorticans* a través de la plataforma Illumina, con el fin de realizar futuros estudios de diversidad, diferenciación genética y estructura genética de poblaciones de chañar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie en estudio

Geoffroea decorticans, es un arbusto o árbol xerófilo, de entre 2 y 12 m de altura, de hojas pinnadas, con un fruto drupáceo y de flores amariposadas, que se reproduce mediante semillas y raíces gemíferas (Burkart, 1949; Echeverría *et al.*, 2020), el cual se distribuye en el cono sur, específicamente en Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay (Salinas *et al.*, 2020). En Chile, *G. decorticans* se distribuye en el desierto de Atacama, desde la Región de Arica-Parinacota hasta la región de Coquimbo, en un rango altitudinal de 100-2600 m (Rodríguez *et al.*, 2018). *Geoffroea decorticans* dispersa su polen preferentemente vía polinización entomófila (polinización cruzada y reproducción de tipo xenogamia facultativa), sin embargo, también se ha observado autofecundación parcial (autogamia) (Eynard & Galetto, 2002).

Aislamiento de ADN y secuenciación

Se colectaron hojas frescas de *G. decorticans* de seis individuos de la Región de Arica-Parinacota (Valle de Azapa y Valle de Chaca), seis individuos de la Región de Tarapacá (poblado de Pachica y poblado de Matilla), seis individuos de Región de Antofagasta (San Pedro de Atacama), seis

individuos de la Región de Atacama (Valle de Copiapó, Totoral y Valle Alto del Carmen) y seis individuos de la Región de Coquimbo (Valle de Elqui) (Tabla 1). La identificación taxonómica de los 30 individuos se realizó de acuerdo con las descripciones reportadas por Burkart (1949). Durante la recolección, las muestras se mantuvieron a 4 ° C; posteriormente, se almacenaron a -80 ° C en el laboratorio. Se depositaron seis muestras en el herbario del Departamento de Silvicultura y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile (EIF, Código Index Herbariorum), bajo el siguiente número de voucher y localidad: EIF13800 (Valle de Chaca), EIF13803 (Valle de Chaca), EIF13807 (Valle de Azapa), EIF13809 (Valle de Azapa), EIF13812 (Valle de Copiapó) y EIF13815 (Valle de Copiapó).

El ADN se aisló de hojas mediante el protocolo de bromuro de cetil-trimetilamonio modificado (CTAB) descrito por Contreras *et al.* (2019). La calidad y concentración del ADN genómico extraído de las muestras se verificó mediante el uso de un espectrofotómetro de microvolúmenes Colibri (Titertek-Berthold, Pforzheim, Alemania). Para ello, se utilizó la relación de absorbancia a 260/280 nm para evaluar la pureza del ADN, cuyo valor óptimo es ~ 1,7 y, por otro lado, se utilizó la relación 260/230 como medida secundaria de pureza, cuyo valor aceptable se encuentra entre 2,0 y 2,2 (Demeke & Jenkins, 2010; Aleksic *et al.*, 2012). El ADN extraído de chañar se cuantificó con un fluorómetro Qubit™ 3.0 y un Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, San Diego, CA) de acuerdo con el manual proporcionado por el fabricante. La muestra de ADN de chañar se almacenó a -80 ° C y la integridad del ADN se verificó con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, San Diego, CA) antes de la secuenciación. A partir de una muestra de ADN de chañar, las bibliotecas de secuenciación se generaron mediante un kit TruSeq Nano DNA LT (Illumina, San Diego, CA). Las bibliotecas finales se realizaron en un bioanalizador Agilent 2100 para verificar la distribución y concentración del tamaño de los fragmentos. La secuenciación se realizó usando el servicio Genoma Mayor (Universidad Mayor, Chile) con una plataforma de secuenciación Illumina. Las secuencias se enviaron al Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Tabla 1. Localización de muestras de *Geoffroea decorticans* utilizadas en el presente estudio y sus coordenadas geográficas en Chile.

Código	Región	Latitud (S)	Longitud (W)
Azapa_1	Arica-Parinacota	18°29'34.9"	70°16'42.7"
Azapa_2	Arica-Parinacota	18°30'20.9"	70°12'58.6"
Azapa_3	Arica-Parinacota	18°30'08.2"	70°14'56.2"
Azapa_4	Arica-Parinacota	18°29'52.9"	70°15'51.6"
Chaca_1	Arica-Parinacota	18°48'09.8"	70°10'13.2"
Chaca_2	Arica-Parinacota	18°48'10.8"	70°10'12.9"
Pachica_1	Tarapacá	19°51'51.3"	69°24'29.6"
Pachica_2	Tarapacá	19°51'49.0"	69°24'37.4"
Pachica_3	Tarapacá	19°51'48.2"	69°24'37.1"
Pachica_4	Tarapacá	19°51'46.4"	69°24'38.3"
Matilla_1	Tarapacá	20°30'57.8"	69°21'41.5"
Matilla_2	Tarapacá	20°30'58.0"	69°21'41.5"
Calama_1	Antofagasta	22°27'51.4"	68°54'37.4"
Calama_2	Antofagasta	22°27'51.1"	68°54'37.0"
SanPedro_1	Antofagasta	22°57'17.5"	68°13'50.5"
SanPedro_2	Antofagasta	22°57'15.5"	68°13'47.8"
SanPedro_3	Antofagasta	22°57'15.1"	68°13'46.9"
SanPedro_4	Antofagasta	22°57'14.8"	68°13'47.1"
Copiapo_1	Atacama	27°19'49.7"	70°34'06.8"
Copiapo_2	Atacama	27°20'12.2"	70°35'46.1"
Copiapo_3	Atacama	27°19'21.2"	70°50'39.8"
Totoral_1	Atacama	27°54'02.3"	70°57'42.42
ADC_1	Atacama	28°46'41.5"	70°28'21.3"
ADC_2	Atacama	28°46'42.5"	70°28'17.5"
Vicuña_1	Coquimbo	30°02'29.6"	70°43'21.2"
Elqui_2	Coquimbo	29°58'31.7"	70°58'32.9"
Coquim_1	Coquimbo	30°02'29.9"	70°43'21.5"
Coquim_2	Coquimbo	30°02'29.8"	70°43'21.7"
Coquim_3	Coquimbo	30°02'38.5"	70°42'54.7"
Coquim_4	Coquimbo	30°02'38.5"	70°42'55.4"

Búsqueda de SSRs

Las lecturas de secuenciación sin procesar se sometieron a un riguroso proceso de filtrado. Se eliminaron las lecturas con > 10% de bases con una puntuación de calidad de Q <30 (control de calidad Q30), lecturas que representaban ARN

no codificante, secuencias ambiguas representadas como "N", lecturas vacías y contaminantes del adaptador. Para garantizar la precisión y validez de la búsqueda SSR, se filtraron y eliminaron los cóntigos que tenían menos de 300 pb. Las lecturas de las secuencias crudas sentido y antisentido se fusionaron mediante el uso de PEAR versión 0.9.4 (Zhang *et al.*, 2014).

Búsqueda de loci SSR y diseño de cebadores

Se seleccionaron marcadores SSRs en todo el genoma ensamblado mediante el programa MISA (Thiel *et al.*, 2003). Se buscó SSRs cuyos motivos comprendieran secuencias que van desde mono a hexanucleótidos y el número mínimo de unidades repetidas se estableció de la siguiente manera: diez unidades repetidas para mononucleótidos, seis para dinucleótidos y cinco para tri-, tetra-, penta- y hexanucleótidos. Se diseñaron pares de cebadores para los loci de SSR seleccionados utilizando el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Los parámetros para el diseño del cebadores incluyó un tamaño de amplicón entre 90-230 pb, un tamaño de cebador entre 18-27 pb, una temperatura de hibridación entre 55-62 ° C y un porcentaje de GC entre 30 y 70%.

Evaluación de nuevos marcadores SSR por PCR

En total, se seleccionaron aleatoriamente 41 pares de cebadores y para la detección de polimorfismos estos se probaron en los 30 individuos de chañar procedentes de 5 sitios. La reacción en cadena de las polimerasas (Polymerase Chain Reaction, PCR) se llevó a cabo en un volumen de 16 µL que contenía 1X de SapphireAmp Fast PCR Master Mix (2X) (Takara-Clontech, EE. UU.), 16 ng de ADN genómico (5 ng/µL), 0,3 µM de cada cebador sentido y antisentido (5 µM) y agua libre de nucleasas. La amplificación por PCR del ADN se realizó en un ciclador térmico Labnet MultiGene OptiMax de acuerdo con el siguiente protocolo: desnaturalización a 94 °C durante 3 min; 40 ciclos de 94 °C durante 25 s, Ta °C (temperatura de hibridación, ver Tabla 3) durante 25 s y 72 °C durante 25 s; y una extensión final a 72 °C durante 3 min. Los productos de amplificación se analizaron posteriormente mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 %, teñidos con tinción de ADN GelRed (10.000X, Biotium). Los tamaños de banda se aproximaron basándose en un marcador de ADN de 100 pb (Thermo Fisher).

Validación de marcador SSR

Se usaron 30 individuos de chañar para obtener productos PCR de 41 marcadores SSR y con ello determinar el tamaño de los alelos y el nivel de polimorfismo. Además, se seleccionaron al azar 18 marcadores SSR para confirmar la existencia de los motivos repetidos SSR, a partir de una muestra de ADN de chañar se prepararon productos SSR-PCR, los cuales luego fueron purificados con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA), secuenciados por MacroGen Inc. y analizados con el programa Chromas Pro v1 (Technelysium Pty, Ltd). Se analizó la presencia de alelos nulos en cada locus con el programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004). Para cada locus, se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y el desequilibrio de ligamiento (LD) con pruebas de permutación (10.000) entre todos los pares de pruebas de loci utilizando Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Los análisis estadísticos de la información de los SSRs, incluido el número de alelos y la frecuencia de los alelos, se calcularon con el programa GenAlEx v. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). El contenido de información de polimorfismo (PIC) para cada locus SSR se estimó de acuerdo con la fórmula $PIC = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia de los diferentes alelos detectados en un locus particular. Un valor de PIC de menos de 0,25 indica un polimorfismo bajo, un valor entre 0,25 y 0,5 indica un polimorfismo medio y un valor superior a 0,5 indica un locus altamente polimórfico (Botstein *et al.*, 1980).

RESULTADOS

Se identificó un total de 144.117 *loci* de microsatélites entre los cóntigos ensamblados por el programa MISA (Tabla 2). Las repeticiones de mononucleótidos fueron las más abundantes, representando 109.988 (76,31%) del total de SSR; seguido de repeticiones de dinucleótidos (21.429; 14,86%), repeticiones de trinucleótidos (10.766; 7,47%), repeticiones de tetranucleótidos (1.504; 1,04%), repeticiones de pentanucleótidos (312; 0,21%) y repeticiones de hexanucleótidos (118; 0,08%). La longitud de SSR más frecuente para los mononucleótidos fue de 10 pb (41.104), mientras que la de los dinucleótidos y trinucleótidos fue de 6 pb (4.704) y 5 pb (4.312), respectivamente; en

Tabla 2. Resultados de la búsqueda de microsatélites en *Geoffroea decorticans*, utilizando el software MISA.

Categoría	Número Total
Número total de secuencias examinadas	1.251.353
Tamaño total de secuencias examinadas (pb)	198.937.034
Número total de SSR identificados	144.117
Número de secuencias que contienen SSR	128.278
Número de secuencias que contienen más de 1 SSR	14.159
Número de SSR presentes en la formación de compuesto	14.778

general, con respecto a las seis clases de motivos SSR, la cantidad de loci disminuyó a medida que aumentaba en el número de repeticiones (Fig. 1). De acuerdo con la distribución de microsatélites sobre la base del tipo de motivo, las repeticiones de mononucleótidos A/T estuvieron altamente representadas (105.806) en las secuencias de *G. decorticans*, mientras que el motivo C/G estaba escasamente representado de acuerdo al número de SSR (4.043) (Fig. 2). Entre las repeticiones en tándem de dinucleótidos, la frecuencia más elevada se observó para los dímeros AG/CT (10.459), seguidos de los dímeros AT/AT (6.879), AC/GT (4.043) y CG/CG (48); los motivos de repetición de trinucleótidos más comunes fueron AAT/ATT (4.244), seguidos de AAG/CTT (2.685), AAC/GTT (1.640), ATC/ATG (885), ACC/GGT (527) y AGG/CCT (437) (Fig. 2).

De 41 pares de cebadores, un total de 38 (93%) presentaron productos y patrones aceptables de amplificación, sin embargo, tres pares de cebadores (7%; SSRGD10371, SSRGD20347, SSRGD9953) presentaron una débil intensidad de producto de amplificación (Tabla 3), no siendo finalmente considerados en los siguientes análisis. Se logró confirmar la presencia del motivo SSR en la secuencia de ADN de todos los productos de amplificación SSR-PCR (dieciocho seleccionados al azar); en nueve de ellos (SSRGD7064, SSRGD12134, SSRGD17398, SSRGD14851, SSRGD6828, SSRGD23664, SSRGD9382, SSRGD11733 y SSRGD20874) la secuencia de ADN se alineó muy bien a la

Tabla 3. Características de 41 loci SSR validados en *Geoffroea decorticans*.

Locus	Motivo	Secuencia de primers (5'-3')	Acceso	T (°C)	Tamaño fragm. (pb)	Nº alelos.	PIC	Ho	He
SSRGD18579	(AGA) ₉	F: CACCCTTGTTTCACCTCTGA R: TTGCGTGAATGAAGTAAAA	MW834594	58	140	6	0.57	0.467	0.433
SSRGD20374	(TTA) ₁₃	F: TCCAAC TATTGCC CAGTTC R: CAAGTAAAAGACTACAAAAAGCCAGA	MW834595	58	129	8	0.82	0.667	0.578
SSRGD27376	(TTA) ₁₀	F: CATCAGAACTCCGCAGTCAA R: CCACGATCGTAAGCCAAAAT	MW834596	58	142	5	0.67	0.687	0.572
SSRGD27558	(GT) ₁₄	F: GAGATGAAGCTTACGCTGGAA R: TTGAACGAACTGGAACTATGG	MW834597	58	150	9	0.86	0.733	0.483
SSRGD25591	(TTC) ₈	F: GAAGGCGTGATGTTGTCTCT R: CGTCCTGGTCCAAC TTCAAT	MW834598	58,5	123	4	0.65	0.967	0.589
SSRGD18623	(TTC) ₁₃	F: CTCCTCAGAGCAACCAGGTC R: GGAGGAGAGGTGCGAGTATG	MW834599	55	119	6	0.70	0.567	0.475
SSRGD7064	(ACC) ₉	F: CTGCTCGGCAAGAGGAAAC R: CAACCCCTTTTACC ACTA	MW834600	58,5	152	4	0.54	0.400	0.431
SSRGD7447	(ACC) ₈	F: CATGCCACAACCAACATTA R: CGGTTTACAAGGGATGCAAT	MW834601	60	115	5	0.65	0.247	0.495
SSRGD12134	(ACC) ₇	F: ATGCTCCACAACAACCTCT R: ATTCGCCGAAC TTCACTTTG	MW834602	58,5	122	3	0.60	0.033	0.342
SSRGD17398	(ACC) ₇	F: GGTATCATGGAGCCCTAAGC R: TAATTCGACAAAGGGGTGGA	MW834603	58,5	115	2	0.49	0.633	0.464
SSRGD14851	(ATC) ₉	F: TTGCAGCGAGTGACTACAGC R: CTTGTTTGGCCTTGACCCTA	MW834604	58,5	150	5	0.68	0.867	0.597
SSRGD7345	(ATC) ₁₃	F: ACCATGATACAACCACCAA R: ATACAAGTGGAAACCAATTTAGATA	MW834605	55	120	7	0.76	0.533	0.583
SSRGD6828	(ATC) ₁₄	F: CGCCAGTTTCACTTTCAGAAC R: CTGACAATGACCAGGAAAATGA	MW834606	59	186	5	0.50	0.333	0.447
SSRGD10786	(AG) ₂₁	F: CAGAGGATTGAGGGTGTGGT R: AAGCAGCGGTTCCATATCAC	MW834607	58,5	151	7	0.80	0.633	0.569
SSRGD23664	(AG) ₂₀	F: TGCATTGAAAGTGAAGAAAAGAA R: GCCACATTTAGGTTATAACACAC	MW834608	58,5	118	5	0.72	0.767	0.553
SSRGD17837	(AG) ₂₈	F: GCGGTGGGTTATAGTGAGAGA R: TCCCTCACTAGCTCCTCTTCC	MW834609	59	147	5	0.78	0.667	0.661
SSRGD17951	(AG) ₂₄	F: CAAATTGGGAGCGAGCTAAG R: CTTGTTGTTGTGCCACTGC	MW834610	59	186	6	0.78	0.467	0.669
SSRGD11258	(CT) ₂₆	F: GTGAGCGTTGACCCTTCC R: AGATT CAGAGAAGTTGCAAAGG	MW834611	60	136	9	0.80	0.800	0.633
SSRGD18579	(AGA) ₉	F: CACCCTTGTTTCACCTCTGA R: TTGCGTGAATGAAGTAAAA	MW834594	58	140	6	0.57	0.467	0.433

R. Contreras *et al.* - Desarrollo de nuevos *loci* de microsatélites para *Geoffroea decorticans*

Locus	Motivo	Secuencia de primers (5'–3')	Acceso	T (°C)	Tamaño fragm. (pb)	N° alelos.	PIC	Ho	He
SSRGD20374	(TTA) ₁₃	F: TCCAAC TATTGCCCCAGTTC R: CAAGTAAAAGACTACAAAAAGCCAGA	MW834595	58	129	8	0.82	0.667	0.578
SSRGD27376	(TTA) ₁₀	F: CATCAGA AACTCCGCAGTCAA R: CCACGATCGTAAGCCAAAAT	MW834596	58	142	5	0.67	0.687	0.572
SSRGD27558	(GT) ₁₄	F: GAGATGAAGCTTACGCTGGAA R: TTGAACGA AACTGGAACTATGG	MW834597	58	150	9	0.86	0.733	0.483
SSRGD25591	(TTC) ₈	F: GAAGGCGTGATGTTGTTCCT R: CGTCCTGGTCCA AACTTCAAT	MW834598	58,5	123	4	0.65	0.967	0.589
SSRGD18623	(TTC) ₁₃	F: CTCCTCAGAGCA ACCAGGTC R: GGAGGAGAGGTGCGAGTATG	MW834599	55	119	6	0.70	0.567	0.475
SSRGD7064	(ACC) ₉	F: CTGCTCGGCAAGAGGAAAC R: CAACCCCTTTTACC ACTA	MW834600	58,5	152	4	0.54	0.400	0.431
SSRGD7447	(ACC) ₈	F: CATGCCACA ACCCAACATTA R: CGGTTTACAAGGGATGCAAT	MW834601	60	115	5	0.65	0.247	0.495
SSRGD12134	(ACC) ₇	F: ATGCTCCACAACA ACCTCCT R: ATTCGCCGA AACTTCACTTTG	MW834602	58,5	122	3	0.60	0.033	0.342
SSRGD17398	(ACC) ₇	F: GGTATCATGGAGCCCTAAGC R: TAATTCGACA AAGGGGTGGA	MW834603	58,5	115	2	0.49	0.633	0.464
SSRGD14851	(ATC) ₉	F: TTGCAGCGAGTGACTACAGC R: CTTGTTTGGCCTTGACCCTA	MW834604	58,5	150	5	0.68	0.867	0.597
SSRGD7345	(ATC) ₁₃	F: ACCATGATACA ACCACCAA R: ATACAAGTGGAA CCAACATTTAGATA	MW834605	55	120	7	0.76	0.533	0.583
SSRGD6828	(ATC) ₁₄	F: CGCCAGTTTCACTTTCAGAAC R: CTGACAATGACCAGGAAAATGA	MW834606	59	186	5	0.50	0.333	0.447
SSRGD10786	(AG) ₂₁	F: CAGAGGATTGAGGGTGTGGT R: AAGCAGCGGTTCCATATCAC	MW834607	58,5	151	7	0.80	0.633	0.569
SSRGD23664	(AG) ₂₀	F: TGCATTGAAAGTGAAGAAAAGAA R: GCCACATTTCA GGTATAACACAC	MW834608	58,5	118	5	0.72	0.767	0.553
SSRGD17837	(AG) ₂₈	F: GCGGTGGGTTATAGTGGAGA R: TCCCTCACTAGCTCCTCTTCC	MW834609	59	147	5	0.78	0.667	0.661
SSRGD17951	(AG) ₂₄	F: CAAATTGGGAGCGAGCTAAG R: CTTGTTGTTGTTGCCACTGC	MW834610	59	186	6	0.78	0.467	0.669
SSRGD11258	(CT) ₂₆	F: GTGAGCGTTGACCCTTCC R: AGATTCAGAGAAGTTGCAAAGG	MW834611	60	136	9	0.80	0.800	0.633
SSRGD3584	(CT) ₂₁	F: TTCTTTGTTGGCCTTGATGA R: TGAAAGGTATAGATCGTCTACTAAAA	MW834612	55	165	4	0.41	0.233	0.358
SSRGD11733	(CT) ₂₁	F: GGGTTTCAAAGTTCATTTACCAA R: AAGCAGA ACCCACATGCTCT	MW834613	55	113	5	0.73	0.767	0.667

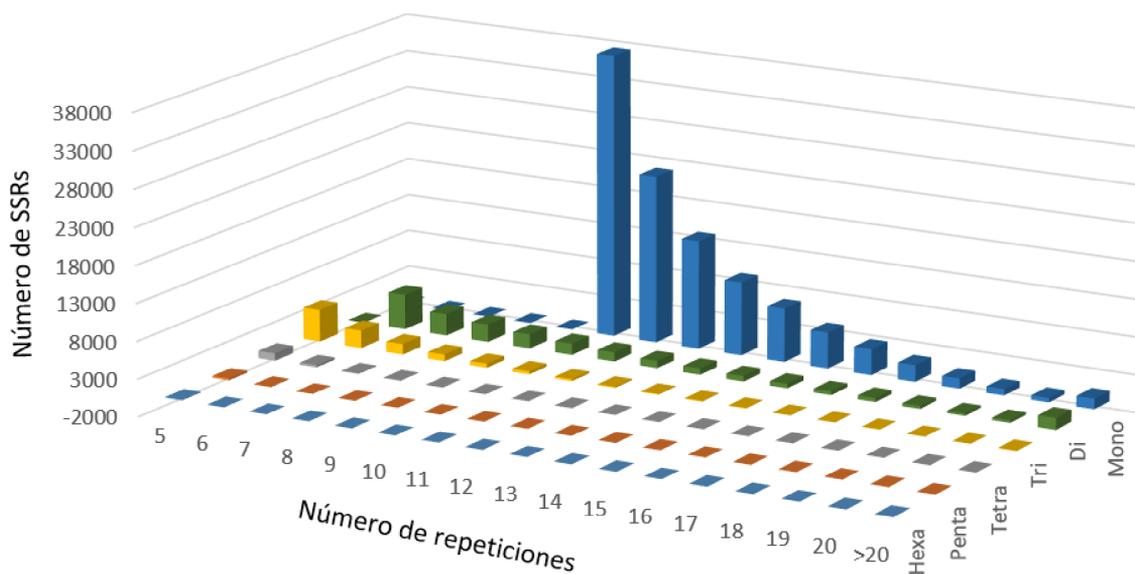


Fig. 1. Distribución de seis clases de motivos SSR (mono a hexanucleótidos) con diferentes números de repeticiones en *Geoffroea decorticans*.

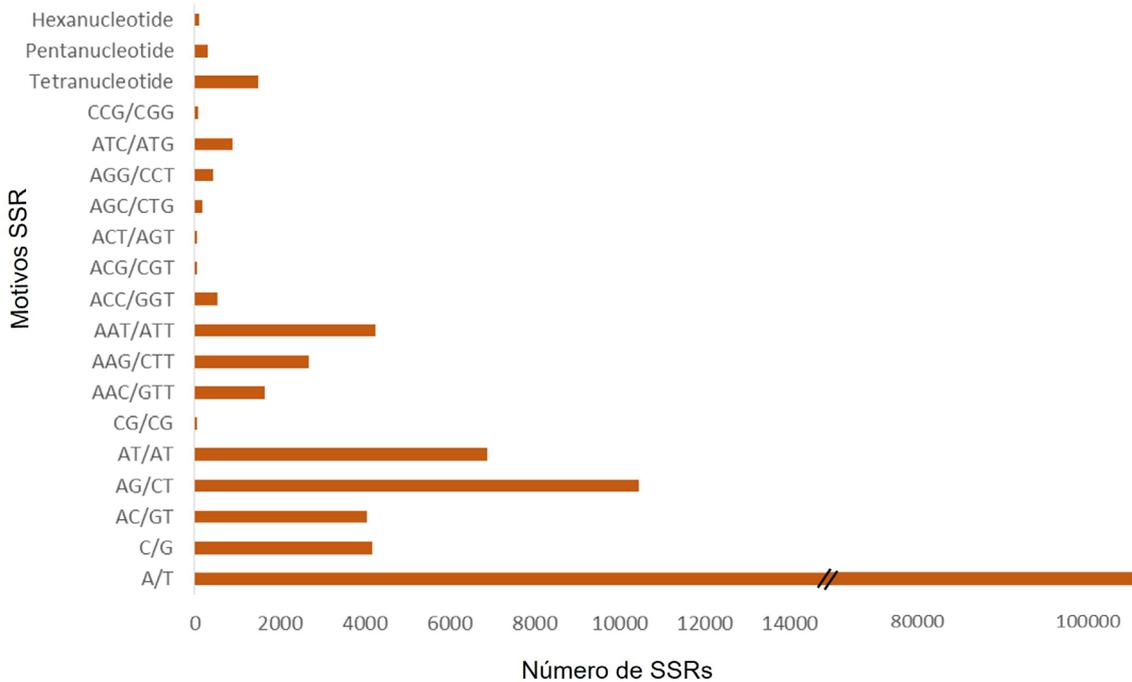


Fig. 2. Número de SSR en *Geoffroea decorticans* según los tipos de motivos.

secuencia de referencia (obtenida por NGS), sin embargo, en las demás secuencias (SSRGD7345, SSRGD4487, SSRGD23813, SSRGD8997, SSRGD8699, SSRGD18623, SSRGD17951, SSRGD17837 y SSRGD11258) se observaron ambigüedades con respecto a la secuencia de referencia. En cuanto a la presencia de alelos nulos, once loci mostraron evidencias de alelos nulos: SSRGD20374, SSRGD7447, SSRGD12134, SSRGD7345, SSRGD6828, SSRGD10786, SSRGD17951, SSRGD3584, SSRGD4487, SSRGD20874 y SSRGD8599. Dieciocho loci presentaron desviaciones significativas de equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$) y 11 loci (SSRGD7064, SSRGD7447, SSRGD12134, SSRGD7345, SSRGD6828, SSRGD17951, SSRGD3584, SSRGD16736, SSRGD20874, SSRGD8699 y SSRGD8599) no satisfacen el equilibrio de Hardy-Weinberg, reflejando un déficit en el número de heterocigotos. Las pruebas de desequilibrio de ligamiento fueron significativas en 78 pares de loci para todas las poblaciones ($P < 0,05$), pero después de la corrección de Bonferroni, ninguno de los pares de loci fue significativo. Los fragmentos amplificados variaron de 106 pb a 225 pb; y el número de alelos varió de 2 a 9, con un promedio de 4,7 (Tabla 3). El valor PIC de los 41 loci SSR osciló entre 0,32 y 0,86, con un promedio de 0,64 (Tabla 3), de los cuales 30 loci SSR exhibieron elevado polimorfismo, 8 loci presentaron moderado polimorfismo y ningún loci manifestó bajo polimorfismo (Tabla 3). Por otro lado, el nivel de la heterocigosis observada (H_o) fue entre 0,033 y 0,967, mientras que la heterocigosis esperada (H_e) fue entre 0,056 y 0,669. Las 41 secuencias SSR usadas en este estudio fueron depositadas individualmente en la base de datos de GenBank (desde el acceso MW834594 - MW834634), no obstante, las demás secuencias SSRs de *G. decorticans* (~128.000 secuencias SSR) se ingresaron en la página web “Sequence Read Archive (SRA)” del NCBI, bajo la identificación BioProject ID PRJNA719569 y acceso a BioSample SAMN18613292.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se desarrollaron marcadores SSR para *G. decorticans* a partir de 198

Mb de secuencias obtenidas de la plataforma de secuenciación Illumina. El primer estudio genético realizado en una especie del género *Geoffroea* utilizando marcadores SSR fue realizado por Naciri-Graven *et al.* (2005) y Caetano *et al.* (2012) en la especie *G. spinosa*. Mientras que los primeros estudios de diversidad genética en poblaciones de *G. decorticans* se realizaron utilizando marcadores ISSR y RAPD (Contreras *et al.*, 2018) y luego a partir de la transferencia de marcadores SSR desde la especie *G. spinosa* (Contreras *et al.*, 2019). Con el fin de obtener una mayor resolución en estudios de variabilidad y estructura genética de poblaciones de *G. decorticans*, era necesario un mayor número de marcadores SSR de la especie, ya que hasta el momento no se habían desarrollado marcadores codominantes específicos para *G. decorticans*. Más aún, los marcadores aquí desarrollados podrían ser transferibles a otras especies del género *Geoffroea*, como *G. spinosa*. Los avances realizados en “Next Generation Sequencing” (NGS) han proporcionado un nuevo escenario para la detección de microsatélites y en las últimas décadas se han desarrollado varios proyectos basados en NGS, generando una enorme cantidad de secuencias disponibles en bases de datos públicas (Vieira *et al.*, 2016). En nuestro estudio se obtuvieron aproximadamente 128.000 secuencias SSR (el resto ~16.000 secuencias obtenidas fueron imperfectas) para *G. decorticans* mediante secuenciación NGS, lo cual constituyó un número elevado con respecto al número de secuencias SSR obtenidas en otras especies de la familia *Fabaceae* como *Dalbergia odorifera* (35.774 secuencias SSR; Liu *et al.*, 2019) y *Mimosa scabrella* Benth (290 secuencias SSR; Saiki *et al.*, 2017), y un número similar a *Acacia koa* (130.931 secuencias SSR; Lawson & Ebrahimi, 2018).

En Argentina, el chañar es uno de los árboles más característicos del Chaco Argentino (Giménez & Moglia, 2003). De acuerdo a Orrabalis (2014), el chañar está asociado a otros géneros, como *Prosopis*, *Aphyllanthes* y *Schinus*, entre otros, los cuales están establecidos en la Provincia Chaqueña, Provincia del Monte y Provincia del Espinal en una superficie de 67.490.000 ha, 43.380.000 ha y 33.000.000 ha, respectivamente. Mientras que en todo el territorio chileno la superficie total es de aprox. 2.000 ha (MMA 2021). Sin duda, estas diferencias de superficie hacen importante el estudio

de poblaciones de chañar en Argentina, con el fin de construir la primera línea base de la estructura genética de esta valiosa especie. Los 38 loci SSR polimórficos obtenidos en este trabajo también podrían ser útiles para estudiar poblaciones de chañar en Bolivia, Chile, Perú, Paraguay y Uruguay. Además, estos marcadores codominantes podrían identificar y confirmar especies (Dainou *et al.*, 2016), subespecies (Besnard *et al.*, 2008) o quizás variantes del género *Geoffroea*, como por ejemplo *G. decorticans* var *decorticans*, *G. decorticans* var. *subtropicalis* descrita por Lamarque *et al.* (2009), o bien las especies *G. horsfieldii* y *G. violaceae* las cuales aún no están del todo definidas en el género (Plant List, 2021).

En el norte de Chile, particularmente en el Desierto de Atacama, recientemente se han realizado estudios con marcadores SSR específicos en especies de Fabáceas como *Prosopis chilensis*, *Prosopis alba*, *Prosopis flexuosa* (Moncada *et al.*, 2019; Bessega *et al.*, 2021) y *Balsamocarpon brevifolium* (Stoll *et al.*, 2020), sin embargo, no se han estudiado marcadores SSR específicos para *G. decorticans*. En esta última especie, se realizó un estudio con cinco marcadores SSR en ocho poblaciones de chañar (84 individuos en total), de los cuales tres marcadores (Gsp.A149, Gsp.B284 y Gsp.A104) mostraron un elevado polimorfismo (PIC > 0,78) y elevado número de alelos (>9) (Contreras *et al.*, 2019), mientras que en el presente trabajo, para 30 individuos, se observó un elevado polimorfismo (PIC > 0,78) en siete marcadores (SSRGD20374, SSRGD27558, SSRGD10786, SSRGD17837, SSRGD17951, SSRGD11258 y SSRGD12427) y también elevados valores (PIC > 0,5) en 31 marcadores SSR. Por lo tanto, el presente trabajo proporciona un elevado número de marcadores SSR polimórficos exclusivos para el estudio genético de poblaciones de *G. decorticans*, siendo interesante en el futuro considerarlos para estudios de estructura genética en poblaciones de países del cono sur, sobre todo donde se encuentra más poblado, como Argentina. De todas maneras, sería recomendable que en futuros estudios de diversidad y estructura genética de poblaciones naturales de *Geoffroea decorticans* se seleccione desde este estudio un set menor de marcadores SSRs y realizar un análisis con un mayor número de individuos, de manera de cuantificar los alelos con cebadores fluorescentes y procesarlos en

un analizador de fragmentos. En ese caso, se recomienda utilizar el método de tres cebadores propuesto por Schuelke (2000) para economizar el marcado de los cebadores fluorescentes.

En conclusión, por primera vez se han desarrollado marcadores SSR putativamente neutros para la especie *G. decorticans* con el fin de apoyar estudios genéticos para la conservación de la especie. El presente estudio provee un conjunto de 38 nuevos marcadores SSR polimórficos, los cuales podrían servir como una herramienta efectiva para estimar diversidad genética, flujo de polen, estructura genética de poblaciones y para ser empleado en programas de mejora.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

RC diseñó la investigación, coleccionó el material de campo, dirigió la investigación y registró las muestras en herbario. MA, WHM y BD procesaron las muestras y realizaron los ensayos moleculares. RC, WHM y FC realizaron los análisis de los datos. RC, FC, WHM, MA y BD participaron en la revisión y escritura del manuscrito

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Atacama en el marco del Proyecto DIUDA 19/18, 22380, y por el proyecto FIC BIP 30432984-0 del Gobierno Regional de Atacama. Agradecemos a la Corporación Nacional Forestal (CONAF) por el permiso de muestreo. Por otro lado, agradecemos los valiosos comentarios realizados por los evaluadores. Además, se agradece el apoyo de Isabel J. Arias, Roberto C. Jordán y César C. Jordán en las labores de muestreo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEKSIC, J. M., D. STOJANOVIĆ, B. BANOVIĆ & R. JANČIĆ. 2012. A simple and efficient DNA isolation method for *Salvia officinalis*. *Biochem. Genet.* 50: 881-892.
<https://doi.org/10.1007/s10528-012-9528-y>
- BESNARD, G., C. GARCIA-VERDUGO, R. R. DE CASAS, U. A. TREIER, N. GALLAND & P.

R. Contreras *et al.* - Desarrollo de nuevos *loci* de microsatélites para *Geoffroea decorticans*

- VARGAS. 2008. Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Ann. Bot.* 101: 25-30. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm275>
- BESSEGA, C., C. POMETTI, R. FORTUNATO, F. GREENE, C. M. SANTORO & V. MCROSTIE. 2021. Genetic studies of various *Prosopis* species (Leguminosae, Section Algarobia) co-occurring in oases of the Atacama Desert (northern Chile). *Ecol. Evol.* 11: 2375–2390. <https://doi.org/10.1002/ece3.7212>
- BOTSTEIN, D., R. D. WHITE, M. SKOLNICK & R. W. DAVIS. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- BURKART, A. 1949. La posición sistemática del “chañar” y las especies del género *Geoffroea* (Leguminosae-Dalbergieae). *Darwiniana* 9: 9-23. <http://www.jstor.org/stable/23211719>
- CAETANO, S., M. CURRAT, R. T. PENNINGTON, D. E. PRADO, L. EXCOFFIER & Y. NACIRI. 2012. Recent colonization of the Galapagos by the tree *Geoffroea spinosa* Jacq. (Leguminosae). *Mol. Ecol.* 21: 2743–2760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05562.x>
- CASTRO, L. C. 2020. El bosque de la Pampa del Tamarugal y la industria salitrera: el problema de la deforestación, los proyectos para su manejo sustentable y el debate político (Tarapacá, Perú-Chile 1829-1941). *Scr. Nova* 24: 1-37.
- CITTADINI, M. C., I. GARCÍA-ESTÉVEZ, M. T. ESCRIBANO-BAILÓN, R. M. BODOIRA, D. BARRIONUEVO & D. MAESTRI. 2021. Nutritional and nutraceutical compounds of fruits from native trees (*Ziziphus mistol* and *Geoffroea decorticans*) of the dry chaco forest. *J. Food Compost. Anal.* 97: 103775. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103775>
- CONTRERAS, R., V. PORCILE & F. AGUAYO. 2018. Genetic diversity of *Geoffroea decorticans*, a native woody leguminous species from Atacama Desert in Chile. *Bosque* 39: 321-332. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002018000200321>
- CONTRERAS, R., V. PORCILE & F. AGUAYO. 2019. Microsatellites reveal a high genetic differentiation among native *Geoffroea decorticans* populations in Chilean Atacama Desert. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 54: 225-240. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v54>
- CONTRERAS, R., F. S. CAREVIC, V. PORCILE & M. ARIAS. 2020a. Development of SSR loci in *Prosopis tamarugo* Phillipi and assessment of their transferability to species of the *Strombocarpa* section. *For. Syst.* 29: e012. <https://doi.org/10.5424/fs/2020292-16706>
- CONTRERAS, R., L. VAN DEN BRINK, B. BURGOS, M. GONZÁLEZ & S. GACITÚA. 2020b. Genetic Characterization of an Endangered Chilean Endemic Species, *Prosopis burkartii* Muñoz, Reveals its Hybrids Parentage. *Plants* 9: 744. <https://doi.org/10.3390/plants9060744>
- COSTAMAGNA, M. S., R. M. ORDOÑEZ, I. C. ZAMPINI, J. E. SAYAGO & M. I. ISLA. 2013. Nutritional and antioxidant properties of *Geoffroea decorticans*, an Argentinean fruit, and derived products (flour, arropo, decoction and hydroalcoholic beverage). *Food Res. Int.* 54: 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.038>
- COTABARREN, J., D. J. BROITMAN, E. QUIROGA & W. D. OBREGÓN. 2020. GdTI, the first thermostable trypsin inhibitor from *Geoffroea decorticans* seeds. A novel natural drug with potential application in biomedicine. *Int. J. Biol. Macromol.* 148: 869-879. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.214>
- DAÏNOU, K., C. BLANC-JOLIVET, B. DEGEN, P. KIMANI, D. NDIADÉ-BOUROBOU, A. S. DONKPEGAN, F. TOSSO, E. KAYMAK, N. BOURLAND, J. L. DOUCET & O. J. HARDY. 2016. Revealing hidden species diversity in closely related species using nuclear SNPs, SSRs and DNA sequences - a case study in the tree genus *Milicia*. *BMC Evol. Biol.* 16: 259. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0831-9>
- DEMEKE, T. & G. R. JENKINS. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1977-1990. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>
- ECHEVERRÍA, J., N. Y. PANIAGUA-ZAMBRANA & R. W. BUSSMANN. 2020. *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart Fabaceae. In: N. PANIAGUA-ZAMBRANA & R. BUSSMANN (eds.), *Ethnobotany of the Andes. Ethnobotany of Mountain Regions*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2_128-1
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL & S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>

- EYNARD, C. & L. GALETTO. 2002. Pollination ecology of *Geoffroea decorticans* (Fabaceae) in central Argentine dry forest. *J. Arid Environ.* 51: 79-88. <https://doi.org/10.1006/jare.2001.0923>
- FOX, G., R. F. PREZIOSI, R. E. ANTWIS, M. BENAVIDES-SERRATO, F. J. COMBE, W. E. HARRIS, I. R. HARTLEY, A. C. KITCHENER, S. R. DE KORT, A. I. NEKARIS *et al.* 2019. Multi-individual microsatellite identification: A multiple genome approach to microsatellite design (MiMi). *Mol. Ecol. Resour.* 19: 1672–1680. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13065>
- GIMÉNEZ, A. M. & J. G. MOGLIA. 2003. Árboles del Chaco Argentino, Guía para el reconocimiento dendrológico [online]. Disponible en: <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/publicaciones/libro-arboles-del-chaco/libro-arboles-del-chaco-argentino-GIMENEZ-MOGLIA.pdf>. [Acceso: 04 de abril de 2021].
- GIMÉNEZ, A. M. 2004. Anatomía comparada de leño y corteza de *Geoffroea striata* y *Geoffroea decorticans*. *Madera y bosques* 10: 55-68. <https://doi.org/10.21829/myb.2004.1011279>
- GROOM, A. 2012. *Geoffroea decorticans*. En: The IUCN Red List of Threatened Species 2012 [online]. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/62502/20075550> [Acceso: 10 de abril de 2021].
- IRELAND & PENNINGTON. 1999. A revision of *Geoffroea* (Leguminosae-Papilionoide). *Edinb. J. Bot.* 56: 329-347.
- JIMÉNEZ-ASPEE, F., C. THEODULOZ, M. D. P. C. SORIANO, M. UGALDE-ARBIZU, M. R. ALBERTO, I. C. ZAMPINI, M. I. ISLA, M. J. SIMIRGIOTIS & G. SCHMEDA-HIRSCHMANN. 2017. The Native Fruit *Geoffroea decorticans* from Arid Northern Chile: Phenolic Composition, Antioxidant Activities and In Vitro Inhibition of Pro-Inflammatory and Metabolic Syndrome-Associated Enzymes. *Molecules* 22: 2-18. <https://doi.org/10.3390/molecules22091565>
- LAMARQUE, A., D. LABUCKAS, J. GREPPI & R. FORTUNATO. 2009. Electrophoretic analysis of *Geoffroea* (Leguminosae, Papilionoideae): taxonomic inferences in Argentinean populations. *Austral. Syst. Bot.* 22: 137-142. <https://doi.org/10.1071/SB08022>
- LAWSON, S. & A. EBRAHIMI. 2018. Development and validation of *Acacia koa* and *A. koaia* nuclear SSRs using Illumina sequencing. *Silvae Genet.* 67: 20-25. <https://doi.org/10.2478/sg-2018-0003>
- LIU, F. M., Z. HONG, Z. J. YANG, N. N. ZHANG, X. J. LIU & D. P. XU. 2019. De novo transcriptome analysis of *Dalbergia odorifera* and transferability of SSR markers developed from the transcriptome. *Forests* 10: 98. <https://doi.org/10.3390/f10020098>
- MAESTRI, D. M., R. H. FORTUNATO, J. A. GREPPI & A. L. LAMARQUE. 2001. Compositional studies of seeds and fruits from two varieties of *Geoffroea decorticans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 585-590. <https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1020>
- MMA (Ministerio de Medio Ambiente). 2021. Ficha de Antecedente de la especie *Geoffroea decorticans* [online]. Disponible en: https://clasificacionspecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/09/Geoffroea_decorticans_17RCE_INICIO.pdf. [Acceso: 04 de abril de 2021].
- MONCADA, X., D. PLAZA, A. STOLL, C. PAYACAN, D. SEELENFREUND, E. MARTÍNEZ, A. BERTIN & F. A. SQUEO. 2019. Genetic diversity and structure of the vulnerable species *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz in the Coquimbo Region, Chile. *Gayana Bot.* 76: 91–104. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432019000100091>
- NACIRI-GRAVEN, Y., S. CAETANO, D. PRADO, R. T. PENNINGTON & R. SPICHTER. 2005. Development and characterization of 11 microsatellite markers in a widespread Neotropical seasonally dry forest tree species, *Geoffroea spinosa* Jacq. (Leguminosae). *Mol. Ecol.* 5: 542-545. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00982.x>
- NÚÑEZ, L., V. MCROSTIE & I. CARTAJENA. 2009. Consideraciones sobre la recolección vegetal y horticultura durante el Formativo temprano en el Sureste de la Cuenca de Atacama. *Darwiniana* 47: 56-75. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2014.471.41>
- ORRABALIS, C. J. 2014. *Aprovechamiento Integral de los Frutos de Geoffroea decorticans (chañar), de la Región Fitogeográfica de la Provincia de Formosa*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- PEAKALL, R. & P. E. SMOUSE. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- PLANT LIST. 2021. Species of the genus *Geoffroea* [online]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Leguminosae/Geoffroea/>. [Acceso: 29 de marzo de 2021].

- RITTER, B., V. WENNRICH, A. MEDIALDEA, D. BRILL, G. KING, S. SCHNEIDERWIND, K. NIEMANN, E. FERNÁNDEZ-GALEGO, J. DIEDERICH, C. ROLF, R. BAO, M. MELLES & T. J. DUNAI. 2019. Climatic fluctuations in the hyperarid core of the Atacama Desert during the past 215 ka. *Sci. Rep.* 9: 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41743-8>
- RODRÍGUEZ, R., C. MARTICORENA, D. ALARCÓN, C. BAEZA, L. CAVIERES, V. L. FINOT, N. FUENTES, A. KIESSLING, M. MIHOC, A. PAUCHARD, E. RUIZ, P. SANCHEZ & A. MARTICORENA. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica* 75: 1- 430. <http://doi.org/10.4067/S0717-66432018000100001>
- ROZEN, S. & H. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386. <http://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>
- SAIKI, F. A., A. P. BERNARDI, M. S. REIS, H. FAORO, E. M. SOUZA, F. O. PEDROSA, A. MANTOVANI & A. F. GUIDOLIN. 2017. Development and validation of the first SSR markers for *Mimosa scabrella* Benth. *Genet. Mol. Res.* 16: gmr16019571. <https://doi.org/10.4238/gmr16019571>
- SALINAS F., R. VARDANEGA, C. ESPINOSA-ÁLVAREZ, D. JIMENÉZ, W. BUGUEÑO, M. C. RUIZ-DOMÍNGUEZ, M. A. A. MEIRELES & P. CEREZAL- MEZQUITA. 2020. Supercritical fluid extraction of chañar (*Geoffroea decorticans*) almond oil: Global yield, kinetics and oil characterization. *J. Supercrit. Fluids* 161: 104824. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104824>
- SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18:233-4. <https://doi.org/10.1038/72708>
- STOLL, A., D. HARPKE, C. SCHÜTTE, L. JIMENEZ, L. LETELIER, F. R. BLATTNER & D. QUANDT. 2020. Landscape genetics of the endangered Atacama Desert shrub *Balsamorhiza brevifolia* in the context of habitat fragmentation. *Glob. Planet. Chang.* 184: 103059. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2019.103059>
- THIEL, T., W. MICHALEK, R. K. VARSHNEY & A. GRANER. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 411-422. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1031-0>
- UGALDE, P. C., V. MCROSTIE, E. M. GAYO, M. GARCÍA, C. LATORRE & C. M. SANTORO. 2020. 13,000 years of sociocultural plant use in the Atacama Desert of northern Chile. *Veg. Hist. Archaeobot.* 30: 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00334-020-00783-1>
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS & P. SHIPLEY. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol.* 4: 535-538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- VARELA, M. C., M. GONZÁLEZ, E. VILLALOBOS, S. GACITÚA & J. MONTENEGRO. 2019. Producción y Comercialización de Productos del Chañar (*Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart) por descendientes de pueblos originarios de la Comuna de Copiapó. Región de Atacama. Chile. *Idesia* 37: 131-137. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292019000300131>
- VIEIRA, M. L., L. SANTINI, A. L. DINIZ & C. DE F. MUNHOZ. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 39: 312-328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
- ZHANG, J., K. KOBERT, T. FLOURI & A. STAMATAKIS. 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina paired-end read merger. *Bioinformatics* 30: 614-620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>

