

INVESTIGACIONES

DIVERSIDAD GENÉTICA EN ACCESIONES CHILENAS DE *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. DETERMINADA MEDIANTE RAPDs (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)^{1, 2}

Genetic diversity in Chilean *Fragaria chiloensis* (L.) Duch accessions determined by RAPDs

Patricio Hinrichsen R.³, Juan Carlos Kuncar I.³, Masashi Hirai⁴, Carlos Muñoz S.³ y Arturo Lavín A.⁵

ABSTRACT

The genetic diversity of a Chilean *Fragaria chiloensis* collection (82 accessions collected between 34° and 48° S) was assessed with a genomic analysis technique known as RAPD. Out of 160 primers evaluated only 10% turned out to be informative, yielding a total of 38 polymorphic bands. Band coincidence allowed the calculation of relative genetic similarity values, used to construct a dendrogram and a spatial multidimensional representation (MDS). Genetically diverse groups of Chilean strawberry accessions were not detected, although markers able to separate accessions based upon their geographic origin were identified. Furthermore, genotypes from the interspecific hybrid *F. x ananassa* formed a separate group (relative similarity value of 0.536 regarding *F. chiloensis* accessions), and some *F. vesca* accessions appeared even more divergent (similarity index of 0.125 regarding the *F. x ananassa* plus *F. chiloensis* group). Supporting evidence for the reduced genetic diversity observed in Chilean strawberry germplasm was obtained from using a heterologous ribosomal fragment as a RFLP probe which could not detect any difference between 13 genotypes.

Key words: Chile, strawberry, DNA, molecular markers, RAPD, RFLP.

INTRODUCCIÓN

La frutilla (*Fragaria chiloensis* [L] Duch.) se cultivó en Chile desde épocas precolombinas por pueblos nativos (Picunches y Mapuches),

¹Recepción de originales: 5 de agosto de 1998.

²Financiado parcialmente por Proyecto FONDECYT 1940083.

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439/3, Santiago, Chile. E-mail: phinrich@platina.inia.cl

⁴National Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Ano, Mie, 514-23, Japón.

⁵Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Experimental Cauquenes, Casilla 165, Cauquenes, Chile.

quienes la llamaban *quellghen* y *lahueñe*, dependiendo del color de su fruto. Su dispersión global se inició en el siglo XVIII, cuando Frezier llevó cinco plantas a Europa desde Penco, Chile (Darrow, 1966). A partir de ellas, se generó en Europa el híbrido *Fragaria x ananassa*, por la cruce de *F. chiloensis* x *F. virginiana* Duch., llamada fresa, y al cual pertenecen prácticamente todas las variedades comerciales modernas, las que podrían contener en su acervo genético componentes de germoplasma originalmente chileno.

F. chiloensis pertenece a la familia *Rosaceae* y tiene un genoma octoploide. Se la encuentra

diseminada en distintas áreas de la costa americana del Océano Pacífico, desde Alaska hasta el sur de Chile, estimándose que esta última área sería su centro de origen (Gay, 1865; Darrow, 1966; Staudt, 1962).

La fresa cultivada es una especie de gran interés comercial a nivel mundial y como con la mayoría de las especies frutales de interés para Chile, las variedades cultivadas han sido desarrolladas en el extranjero. Por otra parte, la actual tendencia internacional de proteger las nuevas variedades creadas, hace que su desarrollo con un fondo genético diversificado tenga alto interés. Para *F. chiloensis* se cuenta en Chile con una importante reserva de germoplasma nativo, el que constituye una fuente potencial de caracteres de interés agronómico, como la capacidad de crecer bajo condiciones de estrés hidrosalino, resistencia a enfermedades, plagas y buenas características organolépticas del fruto, entre otras. Más aún, dado que la mayoría de las variedades importantes de fresa tienen una base genética de escasa diversidad (Dale y Sjulín, 1990; Luby *et al.*, 1991) es deseable introducir genes desde germoplasma silvestre, para así disminuir una posible depresión por consanguinidad (inbreeding) o vulnerabilidad a enfermedades (Harrison *et al.*, 1997a).

En el proceso de obtención de una nueva variedad, es conveniente definir con la mayor seguridad posible las relaciones de filogenia de sus progenitores o su similitud genética, de tal forma de aumentar las probabilidades de generar un apropiado nivel de heterocigosis. Como el proceso requiere largo tiempo, con altos costos asociados, en los últimos años se ha incursionado en el uso de marcadores bioquímicos o moleculares, desarrollándose un tipo de "mejoramiento asistido" que podría disminuir el tiempo de selección. Estos marcadores pueden ser productos de expresión del genoma, como proteínas de reserva de las semillas, isoenzimas (Bringham *et al.*, 1981), o determinadas secuencias del genoma (ADN) que se correlacionan con un fenotipo determinado (Haymes *et al.*, 1997).

En los últimos años se han desarrollado numerosas tecnologías destinadas a caracterizar directamente el genoma. Algunas analizan directamente el genoma, como RFLP (polimorfismos genómicos de fragmentos de restricción; Helentjaris *et al.*, 1985), mientras que otras metodologías están basadas en el uso de la reacción de PCR (reacción en cadena de una polimerasa). Entre éstas, RAPD (amplificación de fragmentos con partidores de PCR de diseño aleatorio; Williams *et al.*, 1990; Hancock y Callow, 1994), SSR (amplificación de secuencias hipervariables de microsátelites; Tautz, 1989) y AFLP (una combinación entre RFLP y RAPD que genera numerosos fragmentos polimórficos; Vos *et al.*, 1995) son las más recurridas (para una revisión, ver Staub *et al.*, 1996). La principal ventaja radica en que su identificación no depende de factores ambientales, los que sí pueden afectar la expresión de caracteres morfológicos. Además, el número de *loci* a estudiar es potencialmente ilimitado, ya que se analiza todo el genoma, aumentando considerablemente la probabilidad de identificar marcadores heredables. Finalmente, otra ventaja del uso de los marcadores moleculares es que si bien su identificación es un proceso largo y complejo, una vez desarrollados la selección de segregantes toma un plazo mucho más breve que el empleado por los métodos tradicionales.

En el desarrollo y establecimiento de estas nuevas técnicas de análisis genético molecular, la aparición de la PCR ha significado un cambio muy importante. De estas nuevas metodologías, RAPD es una de las más usadas para diversos propósitos (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), ya que tiene la ventaja de no requerir información previa sobre secuencias específicas del genoma en estudio, es técnicamente simple y de rápida ejecución, usa una pequeña cantidad de ADN y no requiere del uso de compuestos radioactivos (Williams *et al.*, 1993). En la literatura se ha descrito el uso de RAPD para identificar variedades comerciales de fresas (Gidoni *et al.*, 1994; Hancock *et al.*, 1994; Levi *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1996), y

sólo recientemente se publicó un trabajo sobre la diversidad genética de accesiones de *F. chiloensis* y *F. virginiana* de Norteamérica basado en el uso de este tipo de marcador molecular (Harrison *et al.*, 1997b). Por otra parte, se ha demostrado que las bandas obtenidas por RAPD en *F. vesca* tienen un comportamiento mendeliano y pueden ser usadas como marcadores de filogenia (Scott *et al.*, 1992), por lo que esta herramienta fue usada para preparar un mapa de ligamiento en esta especie (Davis y Yu, 1997).

Actualmente, en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) se cuenta con una colección *ex situ* de accesiones de frutilla silvestre chilenas. Con el fin de seleccionar los genotipos más apropiados para iniciar un programa de mejoramiento genético, esta colección está siendo evaluada y caracterizada de acuerdo a caracteres morfológicos y agronómicos. Estos estudios, que han considerado 20 caracteres vegetativos, de las inflorescencias y de los frutos, indican que existe un grado de diversidad fenotípica que permitiría agrupar algunas accesiones de esta colección de *F. chiloensis* de acuerdo a su similitud genética, mientras que otros genotipos no mostraron ninguna asociación con alguno de los grupos encontrados (del Pozo *et al.*, enviado para publicación a HortScience).

Considerando estos antecedentes, el propósito de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de una parte de esta colección de *F. chiloensis* usando marcadores moleculares, y comparar estos resultados con la información obtenida con los descriptores morfológicos. Esto implicó: a) establecer una metodología adecuada para la extracción de ADN genómico de esta especie; b) desarrollar protocolos de RAPD para lograr amplificaciones reproducibles, identificando los partidores más polimórficos; c) evaluar la diversidad genética en la colección de germoplasma nativo mediante RAPD y RFLP; y d) identificar posibles correlaciones entre los polimorfismos detectados y características de interés agronómico y/o distribución geográfica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El germoplasma estudiado correspondió a 82 accesiones de *F. chiloensis* (L.) Duch. colectados en Chile entre los 34° y 48° Latitud Sur y los 70° y 74° Longitud Oeste, entre 1992 y 1995, las que se conservan en una colección *ex situ* en el Centro Experimental Cauquenes de INIA (Cuadro 1). La mayoría de estas accesiones provienen de lugares ubicados al sur del paralelo 41 (XI Región). Además, se incluyeron como genotipos de referencia (“outgroups”) dos variedades de *F. x ananassa* (cvs. ‘Selva’ y ‘Pájaro’) y tres accesiones de *F. vesca* L. (Cuadro 1).

Preparación de ADN para reacciones de PCR y digestión enzimática

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se usó el protocolo descrito por Lodhi *et al.* (1994) con algunas modificaciones. Se pesó 0,5 g de cada muestra de hojas conservadas a -80°C y se molieron en mortero con N₂ líquido. Se agregó 5 mL de tampón de extracción (sal sódica de etilendiaminotetra acetato [EDTA] 20 mM; Tris base 100 mM pH=8,0; NaCl 1,4 M; bromuro de cetriltrimetilamina [CTAB] 2%). Se mezcló y traspasó a tubos de centrifugación de 15 mL agregando a cada tubo 50 mg de polivinilpirrolidona (PVP 40), se mezcló e incubó a 60°C por 30 min y luego se dejó enfriar. Posteriormente se agregó 6 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (IAA) (24:1) y se mezcló por inversión suave (20 a 25 veces), hasta formar una emulsión; se centrifugó a 6.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió 4 mL de la fase acuosa a un tubo de 30 mL. Si la solución mostraba opalescencia por presencia de PVP, se realizó nuevamente la extracción con cloroformo:IAA. A la solución acuosa se le agregó 2 mL de NaCl 5 M más 12 mL de etanol y se mezcló por inversión, hasta la aparición de filamentos de ADN. Se centrifugó a 8.000 rpm por 6 min a temperatura ambiente, descartándose el sobrenadante. Se lavó el

Cuadro 1. Accesiones de *Fragaria chiloensis* (L) Duch. y otras especies analizadas por RAPD y RFLP**Table 1. *Fragaria chiloensis* (L) Duch. accessions and other species analyzed by RAPD and RFLP**

Número de muestra*	Clave colector	Uso en selección (S) y RFLP**	Latitud S***	Longitud O	Lugar de colecta u origen	Provincia
11	92-0-ILO-1A	S / RFLP	34°55'	72°11'	Iloca	Curicó
8	95-3-HUE-1A		35°06'	72°03'	Huelón	Talca
30	95-0-VIL-1A		35°30'	70°57'	Vilches	Talca
12	94-0-BAU-1A		35°48'	72°34'	Pelluhue	Cauquenes
13	95-3-CUR-1A	S / RFLP	35°52'	72°37'	Curanipe	Cauquenes
51	95-3-TCH-5A		36°54'	71°25'	Termas Chillán	Ñuble
57	95-3-LLI-2A	RFLP	37°12'	73°34'	Llico	Arauco
48	95-3-LAJ-1A		37°24'	71°27'	Laguna Laja	Bio Bio
46	95-3-NAH-2A		37°47'	72°49'	Nahuelbuta	Malleco
7	95-3-CAY-1A		37°48'	73°15'	Cayucupil	Arauco
59	95-3-CON-1A		38°03'	73°17'	Contulmo	Arauco
58	95-3-GUI-1A	RFLP	38°38'	71°43'	Conguillío	Cautín
36	95-3-PIN-2A		38°39'	70°57'	Pino Hachado	Cautín
10	95-3-NIM-1A		38°46'	72°55'	Nueva Imperial	Cautín
32	95-3-CUN-1A		38°51'	71°41'	Cunco	Cautín
33	95-3-NIE-1A	RFLP	39°48'	73°23'	Niebla	Valdivia
31	95-3-FLO-1B		40°03'	73°10'	Tres Chiflones	Valdivia
37	95-3-CHA-1A		40°16'	71°58'	Chabranco	Osorno
35	95-3-RIÑ-2A		40°18'	73°11'	Riñinahue	Valdivia
49	95-3-PUY-1A		40°45'	72°06'	Puyehue	Osorno
9	92-2-LTS-1A	RFLP	41°14'	72°45'	Lago Todos los Santos	Osorno
72	92-2-CPU-1A		41°48'	73°47'	Carelmapu	Llanquihue
82	92-2-CPU-2A		41°48'	73°47'	Carelmapu	Llanquihue
69	92-2-GBN-1A		41°48'	74°05'	Punta Guabun	Chiloé
14	92-2-PUQ-1A	S / RFLP	41°49'	73°58'	Puquenun	Chiloé
6	92-2-BRA-1B		41°50'	73°55'	Mar Brava	Chiloé
15	92-2-BRA-1A		41°50'	73°55'	Mar Brava	Chiloé
54	92-2-BRA-1C		41°50'	73°55'	Mar Brava	Chiloé
34	92-2-CAE-1A		41°51'	74°04'	Calle	Chiloé
64	92-2-QUI-2A		41°52'	72°43'	Quildaco	Chiloé
16	92-2-QUI-1A		41°52'	72°43'	Quildaco	Chiloé
17	92-2-CHO-1A	S / RFLP	42°36'	73°46'	Chonchi	Chiloé
53	92-2-CUC-1A		42°40'	74°10'	Cucao	Chiloé
85	92-2-MIC-1A		42°45'	72°30'	Michimahuida	Chiloé
18	92-2-CAM-1B		42°50'	72°53'	Río Camahueto	Chiloé
52	92-2-CAM-1A		42°50'	72°53'	Río Camahueto	Chiloé
41	92-2-FUT-4A		43°08'	71°40'	Futaleufú	Chiloé
45	92-2-FUT-4B		43°08'	71°40'	Futaleufú	Chiloé
47	92-2-FUT-5A	RFLP	43°08'	71°45'	Futaleufú	Chiloé
74	92-2-FUT-5B		43°08'	71°45'	Futaleufú	Chiloé
87	92-2-FUT-6A		43°08'	71°48'	Futaleufú	Chiloé
19	92-2-YEL-1A		43°15'	72°35'	Lago Yelcho	Chiloé
43	92-2-PAL-1A		43°25'	72°05'	Palena	Chiloé

Continuación Cuadro 1. Accesiones de.....

Número de muestra*	Clave colector	Uso en selección (S) y RFLP**	Latitud S***	Longitud O	Lugar de colecta u origen	Provincia
20	92-2-PAL-2C		43°30'	71°55'	Palena	Chiloé
55	92-2-PAL-2A		43°30'	71°55'	Palena	Chiloé
84	92-2-PAL-3A		43°35'	71°45'	Palena	Chiloé
86	92-2-PAL-4A		43°35'	71°47'	Palena	Chiloé
66	92-2-GRA-1A		43°35'	72°25'	Río Grande	Chiloé
21	92-2-MAR-1A		43°47'	72°27'	Balmaceda	Aisén
60	92-2-MAR-1B		43°47'	72°57'	Balmaceda	Aisén
22	92-2-TAP-4B		44°38'	71°39'	La Tapera	Aisén
61	92-2-TAP-4A	RFLP	44°38'	71°39'	La Tapera	Aisén
73	92-2-TAP-4C		44°38'	71°39'	La Tapera	Aisén
76	92-2-TAP-2A		44°38'	71°51'	La Tapera	Aisén
77	92-2-TAP-3A		44°40'	71°45'	La Tapera	Aisén
83	92-2-TAP-1A		44°40'	71°58'	La Tapera	Aisén
23	92-2-CIS-1A		44°43'	72°43'	Puerto Cisne	Aisén
62	92-2-TOR-1A		44°46'	72°13'	Lago Torres	Aisén
27	92-2-VAL-1A		44°52'	72°12'	El Valle	Gral. Carrera
81	92-2-SIM-1A	S / RFLP	45°23'	72°30'	Río Simpson	Aisén
25	92-2-BAL-1A		45°52'	71°51'	Balmaceda	Aisén
42	92-2-BAL-1B		45°52'	71°51'	Balmaceda	Aisén
24	92-2-MAL-2A		46°08'	72°06'	Mallín	Gral. Carrera
39	92-2-MAL-1A		46°08'	72°06'	Mallín	Gral. Carrera
44	92-2-CAR-3A		46°42'	72°41'	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
50	92-2-CAR-3B	RFLP	46°42'	72°41'	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
56	92-2-CAR-2A		46°47'	72°43'	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
67	92-2-GUA-1A		46°50'	72°43'	Pto. Guadal	Gral. Carrera
78	92-2-CAR-4A		46°53'	72°45'	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
28	92-2-CAR-1A		46°56'	72°50'	Lago Gral. Carrera	Gral. Carrera
26	92-2-BER-1A		47°00'	72°46'	Pto. Bertrand	Gral. Carrera
40	92-2-BAK-1A		47°20'	72°50'	Río Baker	Cap. Prat
29	92-2-COC-6A		47°22'	72°38'	Cochrane	Cap. Prat
79	92-2-COC-7A		47°23'	72°38'	Cochrane	Cap. Prat
70	92-2-COC-1A		47°26'	72°40'	Cochrane	Cap. Prat
38	92-2-COC-9A		47°28'	72°55'	Cochrane	Cap. Prat
71	92-2-COC-5A		47°28'	72°15'	Cochrane	Cap. Prat
68	92-2-COC-8A		47°29'	72°52'	Cochrane	Cap. Prat
65	92-2-BAK-2A		47°29'	72°46'	Río Baker	Cap. Prat
63	92-2-COC-3A		47°33'	72°30'	Cochrane	Cap. Prat
75	92-2-COC-4A	S / RFLP	47°33'	72°32'	Cochrane	Cap. Prat
80	92-2-COC-2A		47°33'	72°35'	Cochrane	Cap. Prat
1	<i>F. vesca</i> 1	RFLP			Colección La Platina	
2	<i>F. vesca</i> 2A				Europa (Silvestre?)	
3	<i>F. vesca</i> 2B				Europa (Silvestre?)	
4	<i>F. x ana.</i> "Selva"	RFLP			California, EE.UU.	
5	<i>F. x ana.</i> "Pájaro"				California, EE.UU.	

*El número de muestra corresponde al orden de carga en el gel de electroforesis y coincide con el dendrograma y la representación de MDS.

**S: indica que un genotipo fue usado para la selección inicial de los partidores de RAPD más informativos;

RFLP: indica que este genotipo fue analizado por esta metodología.

***Las accesiones de *F. chiloensis* fueron ordenadas de menor a mayor latitud.

“pellet” con 4 mL de etanol frío al 70% (-20°C), repitiéndose la centrifugación. Se secó el ADN a 37°C aproximadamente por una hora y se resuspendió en 300 µL de tampón TE 0,1x (Tris-HCl 1 mM pH = 8,0; EDTA 0,1 mM). Se pasó cada solución a microtubos de 1,5 mL y a cada uno se le agregó 3 µL de RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 15 min. Algunas muestras en las que se observó un residuo decantado se reextrajeron con 300 µL de cloroformo:IAA y luego se precipitaron con 30 µL de acetato de sodio 3M pH 5,0 y 800 µL de etanol frío (-20°C), centrifugándose a 8.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Una vez eliminada toda traza de alcohol, se resuspendió el pellet en 200 µL de tampón TE 0,1x. Las preparaciones de ADN se conservaron a -20°C.

Calidad y cuantificación del ADN: El ADN se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 1x, conteniendo aproximadamente 5 mg/mL de bromuro de etidio. Se cargaron 5 a 10 µL de las muestras de ADN disueltas en tampón de carga (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilen cianol y 30% de glicerol) y la electroforesis se realizó a 100 mV (60 mA) por aproximadamente 2,5 horas. Se lavó el gel brevemente en agua destilada y se visualizó el ADN sobre una lámpara ultravioleta (254 nm). Para su cuantificación, 10 µL de cada muestra se enrasaron a 1 mL con agua destilada y se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

Reacciones de amplificación usando partidores de diseño aleatorio (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

Amplificación de ADN: Las condiciones para la reacción (realizadas en un termociclador Perkin Elmer) fueron las siguientes: tres ciclos de 95°C por 60 s, 38°C por 70 s y 72°C por 2 min; 37 ciclos de 94°C por 40 s, 42°C por 40 s y 72°C por 1 min; y un ciclo de elongación final de 7 min a 72°C. La reacción de amplificación (volumen total de 11 µL), contenía ADN (10 ng por reacción), tampón de PCR 1X (Promega),

dNTPs (1 mM final), MgCl₂ (2 mM final), el partidador ensayado (0,5 mM final) y *Taq* polimerasa (1 unidad).

Series de partidores empleados: Se usaron las siguientes series de partidores (Operon Technologies Inc.): OPA, OPF, OPG, OPI, OPO, OPU, OPW y OPX. Estas ocho series corresponden a 160 partidores, resuspendidos en agua bidestilada estéril (concentración 10 mM) y mantenidos a -20°C. Para identificar polimorfismos, cada partidador se ensayó inicialmente con seis muestras de ADN de accesiones de *F. chiloensis* seleccionadas por su distribución geográfica (Cuadro 1).

Análisis de los productos de amplificación: Los productos de cada reacción se separaron en geles de agarosa al 1,5% en TBE 1X, en condiciones electroforéticas similares a como se analizó el ADN genómico y cargando en cada pocillo la totalidad del volumen de la reacción de PCR. El ADN fue visualizado por tinción con bromuro de etidio. Los patrones electroforéticos fueron fotografiados usando película Polaroid tipo 667 o película fotográfica convencional de 100 ASA. Como referencia de tamaño molecular se usó ADN del fago λ digerido con *Hind* III (Promega).

Análisis estadísticos: Se realizó un análisis multivariado mediante el programa NTSYS-93 (Rohlf, 1993). Los datos se ordenaron en una matriz rectangular, con filas representando a los marcadores (bandas de ADN polimórficas) y columnas representando a las accesiones. Para cada marcador se ingresó su presencia con un 1 y su ausencia con un 0. Las bandas de identificación dudosa (señal débil o no reproducible) no fueron consideradas. Se usó el programa SIMQUAL para obtener matrices de similaridad entre cada par de accesiones, recurriendo a distintos índices de similitud tales como Simple Matching, Dice o Jaccard; la principal diferencia entre estos índices está en el peso estadístico asignado a las bandas presentes o ausentes (Johns *et al.*, 1997). Estas matrices sirvieron de

base para análisis de agrupamientos jerárquicos usando el algoritmo UPGMA (programa SAHN Clustering). Estos agrupamientos se representaron gráficamente mediante un dendrograma, que permite apreciar las relaciones de similitud genética entre los genotipos analizados. También se preparó una representación en escalas multidimensionales, o MDS (programa MDSCALE, con MXPLOT para gráfico bidimensional y MOD3D para tridimensional), equivalente a un análisis de componentes principales (Rohlf, 1993; y referencias citadas allí).

Reacciones de polimorfismos del tamaño de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Las accesiones usadas para este análisis se eligieron sobre la base de su distribución geográfica (Cuadro 1). Se incluyó, además, una muestra de *F. x ananassa* y una muestra de *F. vesca*.

Digestión del ADN: El ADN genómico fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, respectivamente. Los productos de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 0,7% corrido en TBE 1X durante 3 horas (gel de 10 cm de largo) y luego transferido a una membrana de nylon por difusión forzada (Sambrook *et al.*, 1989). La membrana fue hibridada usando una sonda correspondiente a un gen ribosomal de arroz (pRR217) donada por el Dr. F. Takaiwa, NIAR, Japón (Oono y Sugiura, 1978). La sonda fue seleccionada por haber mostrado polimorfismo al analizar accesiones de germoplasma de otras especies (M. Hirai, comunicación personal), a la vez que se trata de una secuencia repetida en miles de copias en el genoma y altamente conservada en la escala filogenética, lo que aumenta la probabilidad de unión al templado. Para marcar esta sonda se usó el kit de marcación y detección con UTP-digoxigenina (Pharmacia), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La hibridación se realizó a 68°C durante la noche; posteriormente se lavó con 2xSSC; 0,1% SDS y luego con 0,1xSSC; 0,1% SDS. La membrana se trató con

tampón de bloqueo, se incubó con anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (PA), obtenidos de Pharmacia. Las bandas de ADN se revelaron con los sustratos y reactivos de coloración para PA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de ADN de calidad apropiada para análisis genómico

La extracción de ADN de frutilla se realizó mediante el protocolo descrito por Lodhi *et al.* (1994) para otras especies de frutales leñosos. Este protocolo tuvo un rendimiento apropiado, obteniéndose entre 600 y 2.000 µg/mL de ADN por gramo de hoja. El análisis electroforético del ADN genómico mostró un ADN sin degradación que migró como una banda discreta sobre la banda de mayor peso (23 kb) del estándar λ /*Hind* III. Por tratarse de una especie rica en compuestos fenólicos, es necesario el uso de un agente antioxidante como PVP (Levi *et al.*, 1993) que ayuda a mantener la integridad del ADN. De hecho, otros protocolos de purificación usados preliminarmente (resumidos en Rogers *et al.*, 1996) no dieron buenos resultados, obteniéndose ADN parcialmente degradado, no utilizable para su caracterización genética. El compuesto PVP además formaría complejos con distintos polisacáridos facilitando su separación en el proceso extractivo, lo que evita que estos compuestos interfieran con la actividad de la enzima *Taq* polimerasa (Pandey *et al.*, 1996). Este ADN fue usado con buenos resultados en reacciones de amplificación, no así en protocolos que requieren una digestión con enzimas de restricción, como es el caso de RFLP (ver más adelante). Para las reacciones de RAPD, 10 ng de ADN por reacción fueron apropiados para obtener perfiles de amplificación reproducibles (Figura 1), mientras que para RFLP se determinó que entre 2 y 5 µg de ADN fueron suficientes para detectar la hibridación con la sonda empleada. Este ADN debió incubarse durante toda una noche para completar las digestiones.

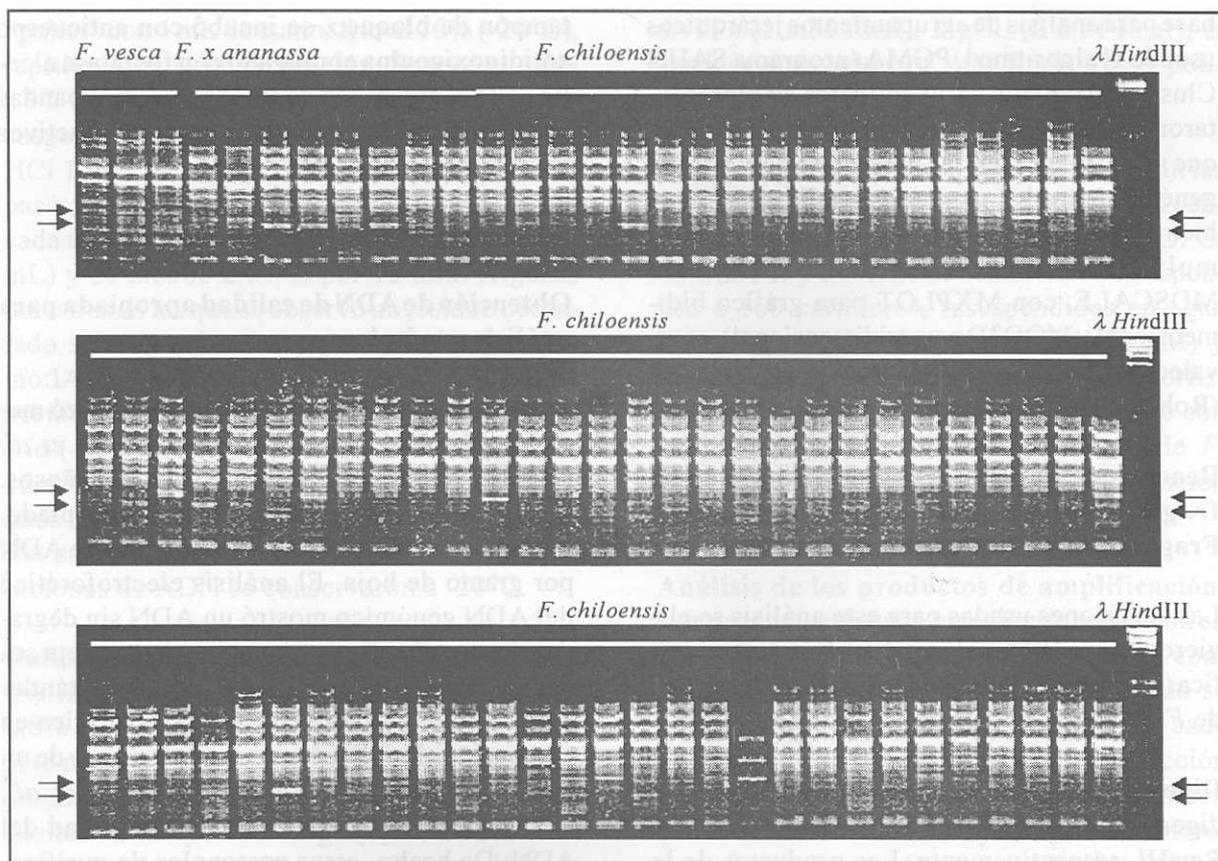


Figura 1. Patrones de amplificación de RAPD usando el partidor OPI-07. Cada carril corresponde a un genotipo diferente: las tres primeras son *F. vesca*, las dos siguientes son *F. x ananassa* (cvs. Selva y Pájaro) y las siguientes corresponden a las 82 accesiones de *F. chiloensis*, coincidente con la numeración dada en el Cuadro 1 (6 al 87, secuencialmente). Las puntas de flecha indican la migración electroforética de dos marcadores (bandas polimórficas). El último carril en cada gel es un estándar de peso molecular (λ /Hind III).

Figure 1. RAPD patterns using OPI-07 primer. Each lane corresponds to a different genotype: the first three are *F. vesca*, followed by two *F. x ananassa* genotypes and then 82 *F. chiloensis* accessions. Codes given in Table 1 (samples 6 to 87, respectively). Arrowheads show migration of two polymorphic bands. Last lane in each gel corresponds to MW standard (λ /Hind III).

Análisis de diversidad basado en RAPD

Las reacciones de RAPD difieren de otros métodos basados en PCR en (i) el uso de partidores de pequeño tamaño (10 mer) y de secuencia aleatoria, (ii) la baja temperatura de apareamiento del partidor al genoma (entre 35 y 45°C) y (iii) un número de ciclos de amplificación mayor que lo usual (Williams *et al.*, 1993). Desde el punto de vista de la optimización de la técnica, los mejores resultados en la reacción de PCR se obtuvieron con un ciclo de amplificación mixto, es decir, los ciclos iniciales se realizaron con

una temperatura de alineamiento de 38°C para facilitar la unión del partidor, mientras que los ciclos restantes se realizaron a 42°C, privilegiando la especificidad en la unión del partidor al ADN genómico de frutilla. Considerando que RAPD tiene su principal falencia en la reproducibilidad de los patrones de amplificación (Jones *et al.*, 1997), este aspecto fue evaluado realizando duplicados (o triplicados) de cada reacción, encontrándose un alto grado de reproducibilidad. Además, la uniformidad de los patrones de bandas de diferentes accesiones con cada partidor confirmó un adecuado nivel de

reproducibilidad (Figura 1). La experiencia en diferentes especies indica que un factor importante para tener buena reproducibilidad en los patrones de amplificación es la calidad apropiada del ADN (Narváez *et al.*, Agricultura Técnica, en prensa).

Sólo 16 partidores de los 160 ensayados (10%) presentaron bandas de ADN polimórficas (Cuadro 2). Estos partidores generaron 38 bandas polimórficas, equivalente a un promedio de 2,4 bandas por cada partidador. La dificultad para identificar partidores que revelaran polimorfismos se debería en parte a que se usaron sólo seis accesiones de *F. chiloensis* para la preselección de los mismos. Por otra parte, esto sugiere *a priori* que el germoplasma de frutilla silvestre analizado por RAPD presenta una escasa diversidad genética, lo cual se ilustra en la Figura 1, correspondiente al bandedo con el partidador OPI-07, donde se encontraron sólo dos bandas polimórficas sobre un total de cerca de 15. Aunque 38 polimorfismos parece una cantidad insuficiente para caracterizar la colección de *F. chiloensis*, algunos antecedentes permiten suponer que este número es apropiado. Por una parte, se ha sugerido que un número mínimo de 50 bandas sería necesario para un estudio de diversidad genética (Wilkie *et al.*, 1993), mientras que para diferenciar dos grupos genéticos de frejoles un análisis basado en "bootstrapping" ha sugerido que 20 bandas polimórficas son suficientes (Johns *et al.*, 1997). La continuación de este

trabajo debiera estar dirigida a obtener un número mayor de marcadores, de tal forma de verificar si se logran separar grupos, o si se aumenta la resolución en la diferenciación de algunos genotipos.

Los polimorfismos de RAPD obtenidos diferenciaron a las distintas especies de *Fragaria* analizadas (*F. chiloensis*, *F. vesca* y *F. x ananassa*), como se aprecia en el dendrograma (Figura 2). Los genotipos más divergentes corresponden a las tres muestras de *F. vesca*; dos de ellas no fueron diferenciadas por este set de 16 partidores, lo que sugiere que serían un mismo genotipo (clon) reproducido vegetativamente. Un segundo grupo corresponde a los dos cultivares de *F. x ananassa*, los que presentaron una similitud relativa de 0,125 respecto a *F. vesca*, y de 0,536 con respecto al conjunto de accesiones de *F. chiloensis*. Entre las dos muestras de *F. x ananassa* se encontró un alto índice de similitud (0,909), equivalente o mayor a la similitud observada entre diferentes accesiones de *F. chiloensis*. La mayor similitud entre *F. x ananassa* y *F. chiloensis* se explicaría por su estrecho parentesco, ya que la primera proviene de la cruce de *F. chiloensis* x *F. virginiana* (Darrow, 1966). Resultados preliminares comparando un mayor número de cultivares de *F. x ananassa* con accesiones de *F. chiloensis* sugieren que su similitud genética sería aun mayor que lo revelado por este estudio (manuscrito en preparación).

Estructura genética de la colección de *F. chiloensis*

En el análisis genético del grupo formado por las accesiones de *F. chiloensis*, tanto el dendrograma generado en base a los valores de similitud (Figura 2) como la representación tridimensional del análisis de tipo multidimensional o MDS (Figura 3) revelaron que no existen grupos de genotipos claramente diferenciados, aunque se insinúa una mayor similitud entre algunos de ellos. El caso más claro lo constituyen la accesión 2 MAR1B, colectada en Aisén, que se encuentra separada en un grupo junto a las

Cuadro 2. Partidores de RAPD que generaron bandas polimórficas con genotipos de *F. chiloensis**

Table 2. RAPD primers producing polymorphic bands on *Fragaria chiloensis* genotypes

OPA-07	OPF-20	OPO-15	OPU-07
OPA-10	OPI-01	OPO-19	OPU-11
OPF-02	OPI-07	OPU-02	OPU-19
OPF-03	OPO-08	OPU-03	OPX-12

*Determinación realizada con los seis genotipos indicados con S en el Cuadro 1.

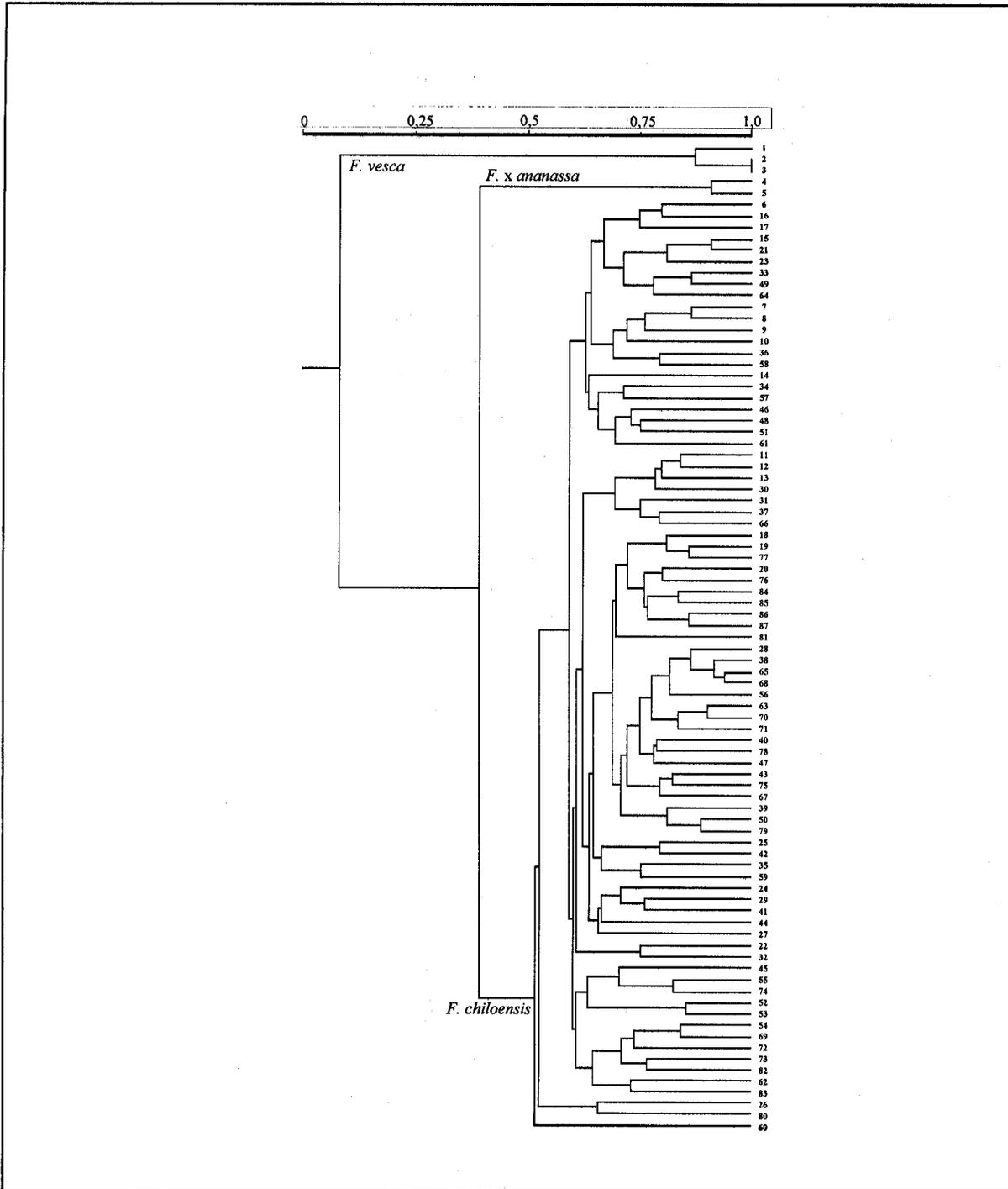


Figura 2. Dendrograma de relaciones genéticas entre las accesiones de *Fragaria* spp. estudiadas, preparado a partir de la matriz de similitud genética entre cada accesión y usando el coeficiente de Jaccard. La escala horizontal indica valores relativos de similitud genética. Los números a la derecha corresponden al número de muestra indicado en el Cuadro 1 (1-3: *F. vesca*; 4-5: *F. x ananassa*; 6-87: *F. chiloensis*).

Figure 2. Dendrogram showing the genetic relationships among *Fragaria* genotypes based on genetic similarity matrix (Jaccard coefficient). Relative similarity scale is on the horizontal bar. Numbers on the right correspond to sample numbers listed on Table 1 (1-3: *F. vesca*; 4-5: *F. x ananassa*; 6-87: *F. chiloensis*).

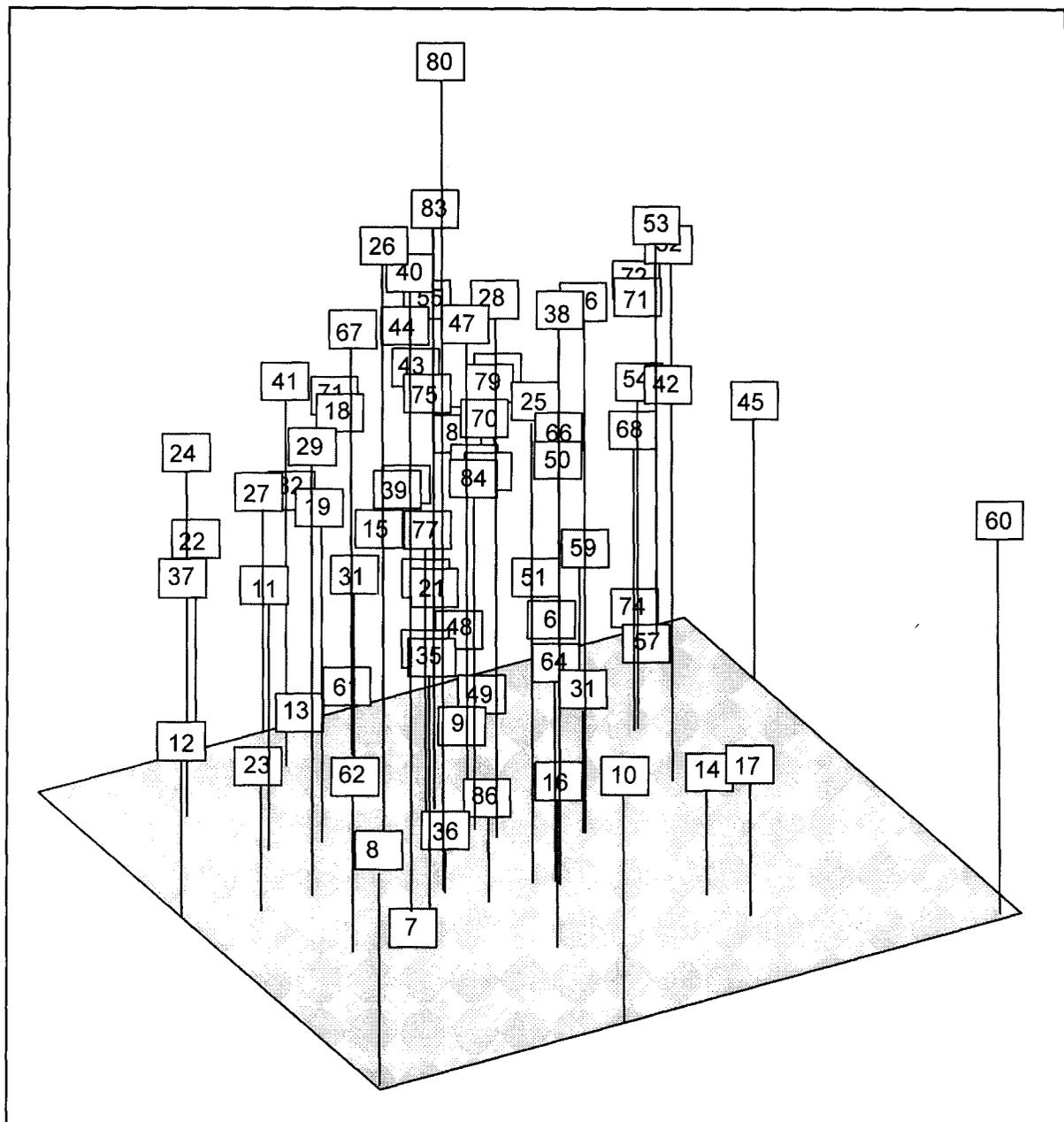


Figura 3. Relaciones genéticas entre las accesiones de *F. chiloensis* (muestras 6 a 87, Cuadro 1) representadas como un escalamiento multidimensional (MDS) basado en los índices de similitud determinados según RAPD. Distintas proyecciones o rotaciones sobre cualquiera de los tres ejes mostraron un aspecto similar, sin grupos separados del conjunto. Se han omitido las muestras de *F. vesca* y *F. x ananassa* para apreciar mejor la estructura de grupo de *F. chiloensis*.

Figure 3. Genetic relationships among *Fragaria* genotypes based upon similarity indexes prepared according to RAPD bands and represented as a tridimensional MDS. Different projections along any of the axes resulted in a similar clustering, without separated groups. *F. vesca* and *F. x ananassa* samples were not considered to get a better estimation of the clustering in *F. chiloensis*.

accesiones 2COC5A y 2BER1A (de las provincias General Carrera y Capitán Prat, respectivamente), con un índice de similitud relativo de sólo 0,714 con respecto a las restantes 79 accesiones. Las demás accesiones de la provincia de Aisén se encuentran distribuidas en seis grupos diferentes y no aisladas en otro cluster independiente. Por otra parte, estos análisis mostraron que 2COC5A y 2BER1A están relativamente cercanas a un grupo de 17 accesiones, donde nueve son de la provincia Capitán Prat y seis de General Carrera, y a otro grupo de cinco accesiones que comprende a tres de General Carrera y una de Capitán Prat, mientras que las accesiones restantes, en ambos grupos, pertenecen a la provincia de Chiloé.

Las restantes 79 accesiones se distribuyen en dos grandes grupos, el primero que incluye a 22 accesiones ordenadas en tres grupos más pequeños, y la segunda con 57 accesiones divididas en dos subgrupos importantes. El primero, con 45 accesiones subdividido en cinco grupos de tercer orden, y el segundo con 12 accesiones con dos subgrupos. En estas agrupaciones destacan: un grupo que abarca a todas las accesiones de la provincia de Llanquihue, dos grupos separados que incluyen a las accesiones colectadas entre los 34 y 35° latitud S (Curicó, Cauquenes y Talca) y otro entre los 35 y 38° latitud S (Talca, Arauco y Cautín). Finalmente, existe una amplia distribución de las accesiones provenientes de Chiloé y Aisén, aunque también se encuentra un grupo de nueve accesiones separadas, de las cuales siete son de Chiloé y dos de Aisén.

El análisis de MDS, que computa los marcadores polimórficos de acuerdo a su peso o valor estadístico (una alternativa al análisis de componentes principales), mostró diferencias genéticas interespecíficas de mayor proporción que las reveladas por el dendrograma (resultados no mostrados). Por su parte, la diversidad genética encontrada entre las accesiones de *F. chiloensis* (Figura 3) fue coincidente con el dendrograma, en cuanto a no mostrar grupos claramente separados, sino más bien una distribución gradual en-

tre los genotipos más divergentes. La muestra 2-MAR-1B (#60) colectada en Balmaceda fue la más divergente, en forma análoga al dendrograma (Figura 2).

Paralelamente a este análisis genómico usando RAPD, se ha realizado una estimación de relaciones genéticas sobre la base de alrededor de 20 descriptores morfológicos, usando una aproximación cladística (del Pozo *et al.*, enviado a HortScience). En ese trabajo se encontraron resultados equivalentes a los presentados aquí, principalmente a nivel de las diferencias interespecíficas (*F. x ananassa* vs *F. chiloensis*). La similitud a nivel intra-específico (*F. chiloensis*), sin embargo, no fue tan alta, aunque en ambos casos se formaron grupos discretos (Figura 2). Un factor que puede disminuir la equivalencia entre ambas aproximaciones (botánica y molecular) es que los genotipos analizados no fueron totalmente coincidentes. Por otra parte, aunque no se ha realizado una comparación sistemática entre los dendrogramas obtenidos con cada aproximación, en ambos casos se observó algún grado de agrupación basado en el origen geográfico de las accesiones colectadas. En este sentido, una observación directa de los patrones de amplificación de algunos partidores permitió identificar algunos marcadores que segregan geográficamente, es decir, bandas de ADN cuya prevalencia es mayor en accesiones del sur o del norte, como se ilustra en la Figura 4 (marcadores OPU-19 y OPU-02). Un análisis de contingencia sobre estos dos marcadores demostró que esta distribución geográfica es estadísticamente significativa (Chi cuadrado = 0,001). Esta diferenciación se podría interpretar como una respuesta adaptativa de los diferentes genotipos frente a distintos ambientes agroecológicos, que representan distintas presiones de selección.

Una estimación del número de bandas polimórficas vs las no polimórficas en las accesiones de *F. chiloensis* indica que no más de un 10% del total de las bandas serían informativas. Si se compara con estudios similares desarrollados en otras especies (Sagredo *et al.*, 1998), este

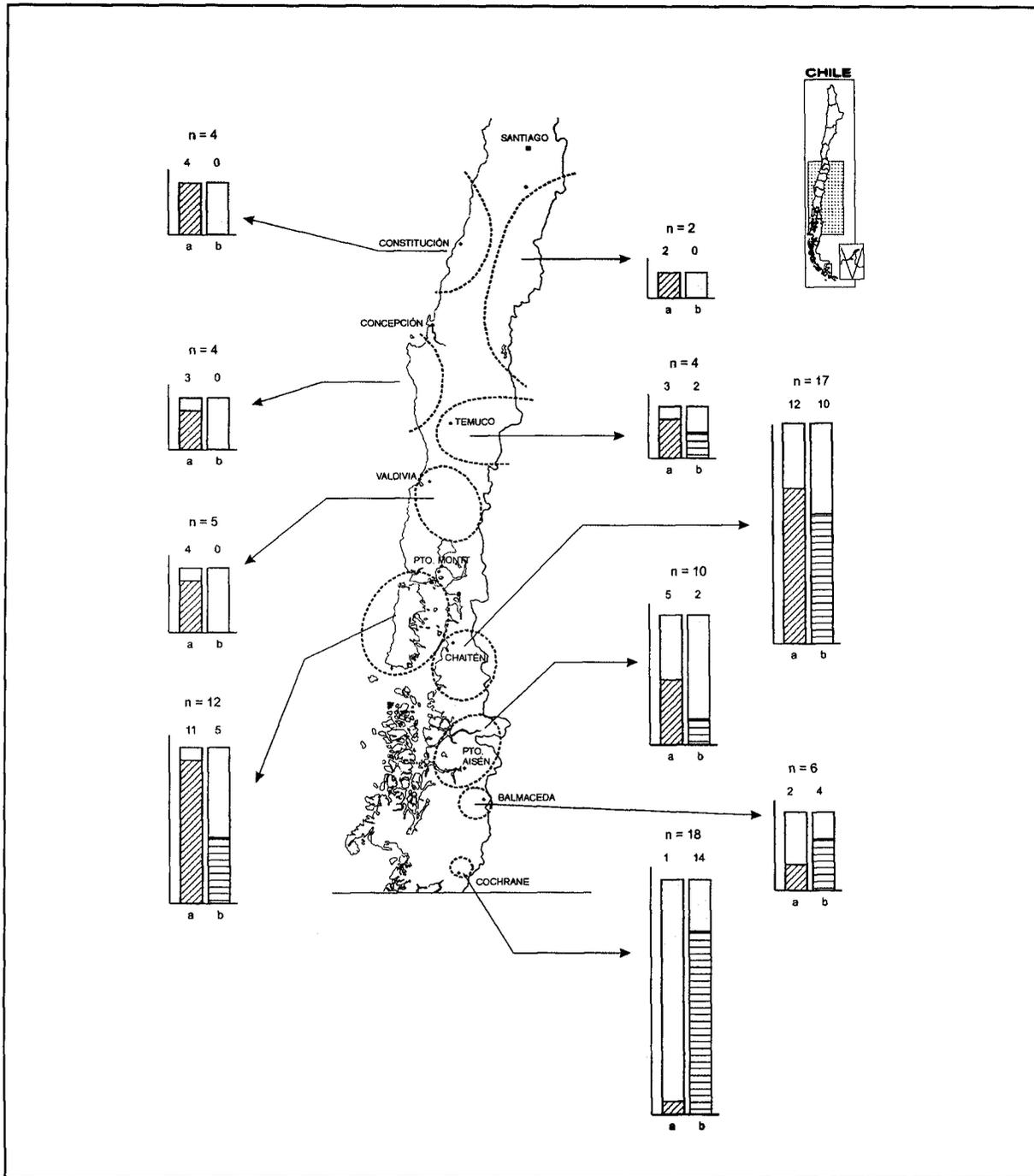


Figura 4. Distribución geográfica de marcadores de RAPD. En cada zona demarcada se indica el número de accesiones comprendidas y la fracción de ellas que presentó una banda polimórfica (barras achuradas). Las barras "a" (achurado diagonal) y "b" (achurado horizontal) representan bandas polimórficas detectadas con el marcador OPU-02 y OPU-19, respectivamente. Por ejemplo, entre las accesiones de la isla de Chiloé (n=12) hay 11 que presentan el marcador a y cinco el marcador b.

Figure 4. Geographical distribution of RAPD markers. In each area, the number of accessions considered and the proportion of them showing a polymorphic band is indicated (stripped bars). Bars "a" and "b" represent polymorphisms revealed by OPU-02 and OPU-19 primers, respectively. As an example, among the Chiloe island accessions (n=12) there are 11 presenting the a marker and five the b marker.

porcentaje puede considerarse bajo en relación al número de accesiones estudiadas (82). Por otra parte, *F. chiloensis* es una especie octoploide (genotipo AAA'A'BBB'B') que se habría originado a partir de especies diploides por un proceso de fusión de gametos no reducidos (Bringhurst, 1990); este hecho aumenta la probabilidad de que los diferentes alelos para cada sitio genético estén representados en cada una de las ocho copias del genoma, disminuyendo la frecuencia de polimorfismos detectables por métodos basados en PCR. Algo similar se ha descrito en otras especies poliploides como trigo (alohexaploide), especie para la cual ha sido difícil encontrar marcadores polimórficos de RAPD (Joshi y Nguyen, 1993), aunque el germoplasma de otros poliploides, como camote (hexaploide), sí presentan una gran diversidad genética al ser estudiado con este tipo de marcadores (He *et al.*, 1995; Sagredo *et al.*, 1998). Finalmente, la multiplicación vegetativa de la frutilla silvestre (preponderante sobre la multiplicación sexual) sería un factor determinante para explicar el bajo nivel de diversidad genética encontrado.

Diversidad genética evaluada por RFLP

La dificultad de identificar bandas polimórficas podría ser propia de un marcador de tipo dominante basado en PCR, como RAPD. Como una alternativa para estudiar las diferencias genéticas en germoplasma de *Fragaria*, se recurrió a un marcador de tipo codominante, como es el RFLP (Staub *et al.*, 1996). Para ello, se estudió el comportamiento de una sonda de ADN de un gen ribosomal de arroz (pRR217; Oono y Sugiura, 1978) frente a 13 accesiones de *F. chiloensis* (Cuadro 1), más una muestra de *F. x ananassa* y otra de *F. vesca*.

En general, se observó un patrón de hibridación claro pero débil con esta sonda heteróloga. La digestión con la enzima *Bam*HI generó un patrón de tres bandas, mientras que el tratamiento con *Eco*RI generó dos bandas, siendo la de mayor peso molecular un doblete (resultados no mos-

trados). No fue posible evidenciar polimorfismos con estas dos combinaciones de sonda/enzima, lo que contrastó con el análisis de RAPD, que diferenció las distintas especies de *Fragaria* y cada accesión de la colección de *F. chiloensis*. El resultado del RFLP tiene sentido, ya que al usar una sonda que reconoce una secuencia altamente conservada a través de la escala filogenética, como un gen ribosomal, disminuye la probabilidad de detectar polimorfismos. Sin embargo, esto contrasta con lo observado originalmente en otras especies, como arroz (M. Hirai, comunicación personal) o *Dioscorea spp.* (Terauchi *et al.*, 1992), en las cuales ha sido posible detectar polimorfismos de RFLP usando esta misma sonda, u otras de naturaleza similar.

Los resultados obtenidos sugieren que la continuación del estudio de la diversidad genética en *F. chiloensis* debiera hacerse recurriendo a una metodología de PCR como es RAPD, u otro de los denominados "marcadores masivos" como AFLP (Vos *et al.*, 1995), dado que se puede estudiar un elevado número de *loci* con relativa facilidad.

Proyecciones hacia la conservación de recursos genéticos y el fitomejoramiento de frutilla

Estos estudios, además de contribuir al conocimiento sobre la estructura genética de las poblaciones de la especie y sus patrones de distribución ecogeográfica, pueden permitir también programar futuras colectas de germoplasma, así como optimizar la conservación de estos recursos genéticos. Otra importante aplicación de estos marcadores es la identificación o "fingerprinting" de accesiones o variedades comerciales (Gidoni *et al.*, 1994; Hancock *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1996), obteniéndose un registro de múltiples aplicaciones prácticas, como análisis de duplicados en bancos de germoplasma, inscripción y protección comercial de variedades, identificación de progenitores, etc. En el futuro se podría aplicar la información generada con estos marcadores moleculares en esquemas de selección

asistida de segregantes (SAS, o MAS en inglés). Aunque en la mayoría de los casos el mejoramiento asistido por marcadores está en etapa de desarrollo, existen ya algunos casos exitosos de aplicación de estas herramientas, especialmente en aquellas especies en que se dispone de un mapa genético suficientemente saturado (Tankley y McCouch, 1997). En este sentido, en *F. vesca* (especie diploide) se ha desarrollado recientemente un mapa de ligamiento basado en 80 marcadores de RAPD sobre una población

segregante de F2, encontrándose una alta proporción de marcadores codominantes (Davis y Yu, 1997). Es posible pensar que esta información será de utilidad en otras especies relacionadas, como base para desarrollar un mapa sintético de las especies del género, o bien estos marcadores podrán ser usados directamente para seleccionar un carácter de interés en fresa, como lo hicieron Haymes *et al.* (1997), quienes identificaron marcadores de RAPD asociados al gen Rpf1, de resistencia a *Phytophthora fragariae*.

RESUMEN

Usando una metodología de análisis genómico basada en PCR, conocida por su acrónimo RAPD, se analizó la diversidad genética de una colección de *Fragaria chiloensis* compuesta por 82 accesiones colectadas en el sur de Chile, entre los 34° y 48° latitud Sur. De un total de 160 partidores ensayados, sólo un 10% resultó informativo, identificándose un total de 38 bandas polimórficas. La coincidencia de bandas polimórficas permitió estimar valores relativos de similitud genética, con los cuales se construyó un dendrograma y una representación multidimensional espacial (MDS). Estos gráficos no evidenciaron la existencia de grupos genéticamente diferentes en el germoplasma chileno de *F. chiloensis*. Sin embargo, se identificaron algunos marcadores capaces de separar subgrupos de accesiones de acuerdo a su origen geográfico. Por

otra parte, genotipos del híbrido interespecífico *F. x ananassa* formaron un grupo separado (similitud relativa de 0,536 respecto al grupo de accesiones de *F. chiloensis*), al igual que algunas accesiones de la especie *F. vesca*, aun más divergente (índice de similitud de 0,125 respecto al grupo de *F. x ananassa* más *F. chiloensis*). El uso de una sonda heteróloga de secuencias ribosomales en un ensayo de RFLP no evidenció diferencias entre los 13 genotipos analizados, donde se incluyeron individuos de las tres especies mencionadas, lo que reforzó la noción de escasa diversidad genética del germoplasma chileno de *Fragaria*.

Palabras claves: Chile, frutilla, ADN, marcadores moleculares, RAPD, RFLP.

LITERATURA CITADA

- BRIGHURST, R. S. 1990. Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. HortScience 25(8): 879-881.
- BRIGHURST, R. S.; ARULSEKAR, S.; HANCOCK JR., J. F. AND VOTH, V. 1981. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: 684-687.
- DALE, A. AND SJULIN, T. M. 1990. Few cytoplasm contribute to North American strawberry cultivars. HortScience 25: 1341-1342.
- DARROW, G. M. 1966. The strawberry. History, breeding and physiology. Holt, Rinehart and Winston. New York, USA. 447 p.

- DAVIS, T. M. AND YU, H. 1997. A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. J. Heredity 88: 215-221.
- DEL POZO, A.; MUÑOZ, M.; LAVÍN, A. AND MAUREIRA, M. Phenotypic variability in accessions of *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. from the South of Chile. Enviado a HortScience.
- GAY, C. 1865. Historia Física y Política de Chile. Agricultura. Imprenta E. Thunot y Cía. París, Francia. Tomo II, p. 113-114.
- GIDONI, D.; ROM, M.; KUNIK, T.; ZUR, M.; IZSAK, E.; IZHAR, S. AND FIRON, N. 1994. Strawberry-cultivar identification using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Plant Breeding 113: 339-342.
- GRAHAM, J.; MCNICOL, R. J. AND MCNICOL, J. W. 1996. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. Theor. Appl. Genetics 93: 402-406.
- HANCOCK, J. F.; CALLOW, P. A. AND SHAW, D. V. 1994. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry, *Fragaria x ananassa*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119: 862-864.
- HARRISON, R. E.; LUBY, J. J. AND FURNIER, G. R. 1997a. Chloroplast DNA restriction fragment variation among strawberry (*Fragaria* spp.) taxa. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 63-68.
- HARRISON, R. E.; LUBY, J. J.; FURNIER, G. R. AND HANCOCK, J. F. 1997b. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (*Rosaceae*) from North America. Am. J. Botany 84: 612-620.
- HAYMES, K. M.; HENKEN, B.; DAVIS, T. M.; WEG, W. E. AND VAN DE WEK, W. E. 1997. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpf1) in the cultivated strawberry. Theor. Appl. Genetics 94: 1097-1101.
- HE, G.; PRAKASH, C. S. AND JARRET, R. L. 1995. Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. Genome 38: 938-973.
- HELENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C. AND WEGMAN, S. 1985. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol. Biol. 5: 109-118.
- JOHNS, M.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G. AND MUÑOZ, C. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. Crop Science 37: 605-613.
- JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M. AND DALY, S. 1997. Reproducibility of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molec. Breed. 3: 381-390.
- JOSHI, C. P. AND NGUYEN, H. T. 1993. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science 93: 95-103.
- LEVI, A.; ROWLAND, L. J. AND HARTUNG, J. S. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. HortScience 28: 1188-1190.

- LEVI, A.; ROWLAND, L. J.; GALLETÀ, G. J.; MARTELLI, G. AND GRECO, I. 1994. Identification of strawberry genotypes and evaluation of their genetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Adv. Strawberry Res.* 13: 36-39.
- LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F. AND REISCH, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molec. Biol. Rep.* 12: 6-13.
- LUBY, J. J.; HANCOCK, J. F. AND CAMERON, J. S. 1991. Expansion of the strawberry germplasm base in North America. *In: Dale, A. and Luby, J.J. (Eds.). The strawberry into the 21st century.* Timber Press. Portland, Oregon, USA. p. 65-75.
- NARVÁEZ, C.; VALENZUELA, J.; MUÑOZ, C. E HINRICHSEN, P. 1999. Comparación de métodos de identificación genética de vid basada en fragmentos genómicos anónimos (RAPD y AFLP). *Agricultura Técnica (en prensa).*
- OONO, K. AND SUGIURA, M. 1978. Isolation of rRNA genes in rice. *Jpn. J. Genet.* 53: 444.
- PANDEY, R. N.; ADAMS, R. P. AND FLOURNOY, L. E. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molec. Biol. Rep.* 14: 17-22.
- ROGERS, H. J.; BURNS, N. A. AND PARKES, H. C. 1996. Comparison of small-scale methods for the rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis. *Plant Molec. Biol. Rep.* 14: 170-183.
- ROHLF, F. J. 1993. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistic Inc. Press. Setauket, New York, USA. 45 p.
- SAGREDO, B.; HINRICHSEN, P.; LÓPEZ, H.; CUBILLOS, A. AND MUÑOZ, C. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. *Euphytica* 101: 193-198.
- SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F. AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York, USA. 550 p.
- SCOTT, M. P.; HAYMES, K. M. AND WILLIAMS, S. M. 1992. Parentage analysis using RAPD-PCR. *Nucleic Acids Res.* 20: 5493.
- STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C. AND GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31: 729-741.
- STAUDT, G. 1962. Taxonomic studies in the genus *Fragaria*: Typification of *Fragaria* species known at the time of Linnaeus. *Can. J. Bot.* 40: 869-886.
- TANKSLEY, S.D. AND MCCOUCH, S. R. 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- TERAUCHI, R.; CHIKALEKE, V. A.; THOTTAPILLY, G. AND HAHN, S. K. 1992. Origin and phylogeny of Guinea yams as revealed by RFLP analysis of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 83: 743-751.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AND ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

- WELSH, J. AND McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- WILKIE, S. E.; ISAAC, P. G. AND SLATER, R. J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497-504.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. AND TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. AND TINGEY, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* (Wu, R., Series Ed.) 218: 704-740.