DIVERSIDAD BIOQUÍMICA Y MOLECULAR EN FRUTILLAS CHILENAS (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) Y SU IMPLICANCIA EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA ESPECIE[1]

Biochemical and molecular diversity in Chilean strawberries (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) and its implication for genetic improvement of the species

Viviana Becerra V.[2], Mario Paredes C.[2], Agnes Romero O.[2] y Arturo Lavín A.[3]

ABSTRACT

The Chilean wild strawberry (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) is a native species of Chile that was domesticated before the arrival of the Spanish. This species is one of the progenitors of the commercial strawberry (*F.* x *ananassa*), and is widely distributed throughout the country in variable agroecological systems. Apparently, these diverse habitats have forced this species to develop a high variability of morphological and agronomic traits. The objectives of this work were: a) to determine the genetic diversity of a representative sample of the Chilean strawberry using biochemical and molecular markers; b) to compare this information by random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity within the same accessions; and c) to determine the feasibility of using this information for a breeding improvement program. Eighty-three Chilean wild accessions were analyzed by three isozyme systems, glucose phosphate isomerase (GPI), leucine amino peptidase (LAP) and phosphoglucomutase (PGM), and sixty-one of them were analyzed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). The results indicated a low level of genetic diversity, only a few accessions were polymorphic for LAP and GPI. The AFLP analysis also detected a low level of polymorphism among the accessions evaluated. The results and their implications for future genetic improvement of the species are discussed.

Key words: isozyme, AFLP marker, genetic diversity.

RESUMEN

La frutilla chilena (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) es una especie nativa de Chile que fue domesticada antes de la llegada de los españoles. Esta especie es uno de los progenitores de la frutilla cultivada (*F.* x *ananassa*) y se encuentra distribuida en una amplia zona del país, colonizando diferentes sistemas agroecológicos. Aparentemente, en estos diversos hábitats se han desarrollado diferentes ecotipos que presentan una gran diversidad de características morfológicas y agronómicas. Los objetivos del trabajo fueron: a) determinar la diversidad genética de una muestra representativa de frutillas chilenas usando marcadores bioquímicos y moleculares; b) comparar la información previamente generada por la amplificación de ADN polimórfico al azar

[1]Recepción de originales: 22 de mayo de 2000.
Investigación financiada por el Proyecto FONDECYT Nº 1980166.
[2]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.
E-mail: vbecerra@quilamapu.inia.cl
[3]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Experimental Cauquenes, Casilla 165, Cauquenes, Chile.

(RAPD) en las mismas accesiones; y c) determinar el posible uso de esta información en un programa de mejoramiento de la especie. En este trabajo se analizaron 83 accesiones silvestres con los sistemas enzimáticos fosfoglucosa isomerasa (GPI), leucina aminopeptidasa (LAP), y fosfoglucomutasa (PGM) y 61 accesiones mediante la amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP). Los resultados del estudio enzimático indicaron una baja diversidad genética y sólo algunos genotipos fueron polimórficos para LAP y GPI. Los resultados de AFLP detectaron también un bajo nivel de polimorfismo entre las accesiones analizadas. Se discuten estos resultados y sus implicaciones sobre el mejoramiento genético de la especie.

Palabras clave: isoenzima, marcador AFLP, diversidad genética.

INTRODUCCIÓN

La frutilla silvestre, *Fragaria chiloensis* L. Duch., también llamada frutilla de la costa de Chiloé, es una especie nativa de Chile, que se encuentra distribuida desde el círculo ártico en el oeste de Norte América hasta el extremo más austral de Chile y Argentina (Bringhurst, 1990; Hancock, 1990).

La frutilla chilena *(Fragaria chiloensis)* y *F. virginiana* son los progenitores de la frutilla comercial (*F.* x *ananassa*). Ambas especies son predominantemente diocas, aunque existe algún porcentaje variable de plantas hermafroditas (Hanckock y Luby, 1993), lo cual contribuye a la alta heterocigocidad de la frutilla cultivada. Debido a esta situación, el proceso de consanguinidad afecta negativamente a la planta, lo que se manifiesta en la rápida pérdida de vigor, rendimiento y tamaño del fruto (Morrow y Darrow, 1952).

Fragaria chiloensis y *F. virginiana* son especies octoploides (2n = 8x = 56), producto de antiguos procesos de poliploidización y selección, actualmente altamente diploidizadas (Bringhurst, 1990). Basados en estos antecedentes, se ha propuesto recientemente una nueva estructura genómica para esta especie, 2A2A'2B2B' (Bringhurst, 1990) en reemplazo de AAA'Â'BBB'B' propuesta anteriormente por Senanayake y Bringhurst (1967).

Fragaria chiloensis y *F. virginiana* están distribuidas sólo en el hemisferio occidental, aunque se postula que la primera especie octoploide se originó en Asia Oriental, y desde allí se habría diseminado hacia Norte América a través del estrecho de Bering. Por otro lado, el origen de la frutilla chilena es poco claro, aunque se presume que fue introducida desde Norte América por aves migratorias. En Chile la especie se ha distribuido en diversas zonas agroecológicas, desarrollando adaptaciones específicas para esos ambientes. Aparentemente, la *F. chiloensis* presente en Chile es más adaptativa que la norteamericana, ya que se encuentra colonizando un mayor rango de situaciones agroclimáticas, en comparación con la totalidad de la zona geográfica ocupada por *F. chiloensis* y *F. virginiana* en Norte América (Hancock *et al.*, 1999).

La frutilla chilena tiene una larga historia de cultivo en nuestro país. Ha sido utilizada por más de 1.000 años por los aborígenes chilenos mapuches y picunches. Se estima que los picunches fueron los primeros habitantes que domesticaron esta especie en América, ya que antes de la llegada de los españoles era cultivada en el centro y sur del país (Hancock *et al.*, 1999). Durante la conquista, los españoles se encargaron de diseminar esta especie a varios países de Norte y Sudamérica, especialmente a Perú, Colombia, Ecuador y posteriormente a Europa, donde dio origen a la actual frutilla cultivada (*F.* x *ananassa*). En 1766, Nicholas Duchesne determinó que la frutilla cultivada era un híbrido entre *F. chiloensis* y *F. virginiana* (Hancock *et al.*, 1999).

La amplia adaptación de *F. chiloensis* chilena a una gran variedad de condiciones agroecológicas y climáticas, y su aparente diferenciación a la *F. chiloensis* norteamericana, hacen suponer la presencia de una gran diversidad genética, que podría ser fuente de genes para los programas de mejoramiento genético de la especie o del híbrido cultivado. Esta hipótesis es apoyada fuertemente por la gran diversidad morfológica y agronómica detectada en las diversas evaluaciones del germoplasma colectado en Chile (Hancock, 1990, Cameron *et al.*, 1993).

La evaluación del material de frutilla se ha realizado principalmente sobre características hortícolas, morfológicas y fisiológicas. Este tipo de evaluaciones está sujeto a una fuerte influencia ambiental, por lo tanto, es necesario completar esta caracterización con otro tipo de marcadores, como son los bioquímicos y moleculares, que puedan ayudar a complementar la información genética presente en la especie.

En frutillas, el uso de las isoenzimas ha estado dirigido principalmente a la identificación de cultivares y a la caracterización de la diversidad genética presente en la frutilla norteamericana y europea (Bringhurst *et al.*, 1981; Nehra *et al.*, 1991; Greco y Martelli, 1993; Bell y Simpson, 1994). El número de sistemas usados en este tipo de trabajos ha sido bastante reducido, debido a que algunos sistemas no presentan polimorfismo, y otros presentan inconsistencia en los patrones isoenzimáticos obtenidos (Bell y Simpson, 1994). Los sistemas más usados han sido glucosa fosfato isomerasa (GPI), leucina amino peptidasa (LAP) y fosfo glucomutasa (PGM) (Arulsekar *et al.*, 1981; Bringhurst *et al.*, 1981; Nehra *et al.*, 1991; Greco y Martelli, 1993; Bell y Simpson, 1994).

Actualmente, los marcadores moleculares presentan un mayor poder de resolución que los marcadores bioquímicos, por lo tanto, presentan varias ventajas para identificar y caracterizar individuos altamente emparentados (Vos *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1996). Entre los marcadores moleculares disponibles con mayor poder de resolución y reproducibilidad, están los fragmentos de amplificación polimórficos (AFLP) que son de herencia dominante, usan una mínima cantidad de ADN y detectan un gran número de *loci* (50-100) por reacción, comparado con la amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD). La técnica combina los principios de los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde primeramente se digiere el ADN con enzimas de restricción y luego se generan los AFLPs por amplificación selectiva.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) determinar la diversidad genética de una muestra representativa de frutillas chilenas usando isoenzimas y AFLP; b) comparar la información generada con RAPD; y c) determinar el posible uso de esta información en un programa de mejoramiento genético de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las accesiones de frutilla chilena silvestre analizadas fueron colectadas entre las regiones VII y XI por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) (Cuadro 1). De este germoplasma se han seleccionado algunos genotipos con características agronómicas superiores para iniciar un programa de mejoramiento.

Análisis isoenzimático
Extracción de la proteína total

La proteína total se obtuvo a partir de hojas apicales en crecimiento activo. Las hojas fueron cosechadas, transportadas y almacenadas a 4 °C por un máximo de tres días antes de ser procesadas. Un total de 83 accesiones y cinco individuos por accesión (Cuadro 1) fueron analizados, también se incluyeron accesiones de *F. virginiana* (1) y *F.* x *anannassa* (2). Aproximadamente 0,5 g de cada muestra fue macerada en un mortero con el tampón de extracción (Tris-citrato, pH 7,5; cisteína hidroclorídrica, 0,1%;

Cuadro 1. Accesiones chilenas analizadas con isoenzimas y amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP)
Table 1. Chilean accessions analyzed by isozymes and amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Accesión	Lugar	Provincia	Latitud sur	Longitud oeste	Altitud m.s.n.m.
Fragaria chiloensis L. Duch					
2COC9A	* Laguna Larga	Cap. Prat	47°28'	72°55'	366
2COC3A	* San Lorenzo	Cap. Prat	47°33'	72°30'	366
2MAL2A	* [a] Mallín Grande	Gral. Carrera	46°08'	72°06'	351
2BAL1B	* [a] Balmaceda	Aisén	45°52'	71°51'	530
2TAP1A	* La Tapera	Aisén	44°40'	71°58'	s/i
2TAP3A	* [a] La Tapera	Aisén	44°40'	71°45'	s/i
2TAP4A	* [a] La Tapera	Aisén	44°38'	71°39'	s/i
2PAL2A	* [a] Río El Salto	Chiloé	43°30'	71°55'	183
2PAL3A	* [a] Palena	Chiloé	43°35'	71°45'	s/i
2FUT4A	* [a] Futaleufú	Chiloé	43°08'	71°40'	s/i
2CAM1A	* [a] Río Camahueto	Chiloé	42°50'	72°53'	2
2BRA1A	* [a] Mar Brava	Chiloé	41°50'	73°55'	2
2QUI2A	* Quildaco	Chiloé	41°51'	72°43'	s/i
2LTS1A	* [a] Lago T. Los Santos	Osorno	41°14'	72°45'	229
3PUY1A	* [a] Paso Card. Samoré	Osorno	40°44'81"	72°05'59"	1.060
3PUY3A	* Puyehue	Osorno	40°41'07"	72°01'02"	1.050
3NIE1A	* [a] Niebla	Valdivia	39°47'59"	73°23'24"	30
3FLO2A	* [a] Tres Chiflones	Valdivia	40°02'80"	73°10'49"	360
3MAI1A	* [a] Lago Maihue	Valdivia	40°12'44"	72°08'29"	s/i
3ICA4A	* [a] Laguna Icalma	Cautín	38°49'53"	71°23'40"	1.285
3ICA8A	* [a] Laguna Icalma	Cautín	38°41'23"	71°20'10"	1.155
3MEL9A	* [a] Captren	Cautín	38°38'34"	71°47'19"	1.210
3NAH2A	* Nahuelbuta	Malleco	37°46'78"	72°49'23"	770
3FRI1A	* [a] Agua fría	Malleco	37°46'02"	72°48'12"	775
3CAY5A	* [a] Cayucupil	Arauco	37°48'18"	73°09'34"	660
3TCH4A	* Termas de Chillán	Chillán	36°54'48"	71°25'41"	1.395
3LLE4A	* Los Lleuques	Chillán	36°54'49"	71°29'58"	1.170
3VIL1A	* [a] Vilches	Talca	35°34'13"	70°37'34"	535
3HUE1A	* [a] Huelón	Talca	35°05'75"	72°03'55"	50
3TRI1A	* Playa Trinchera	Talca	35°06'26"	72°11'50"	10
3RRI1A	* [a] Carrizal	Talca	35°16'45"	72°14'20"	245
3RAH1A	* Rahue	Cauquenes	35°45'45"	72°31'51"	120
3CUR1A	* [a] Curanipe	Cauquenes	35°51'55"	72°37'00"	165
3BUC1A	* Buchupureo	Ñuble	36°05'24"	72°47'16"	225
3COB1A	* [a] Cobquecura	Ñuble	36°12'20"	72°47'42"	155
90SAU1A	* [a] Río Los Sauces	Ñuble	36°25'	71°08'	s/i
3REC1A	* Recinto	Ñuble	36°50'09"	71°40'85"	800
3TCH5A	* [a] Termas de Chillán	Ñuble	36°54'27"	71°24'54"	1.500
3RAM1A	* [a] Ramadilla	Arauco	37°20'21"	73°13'58"	240
3LAJ2A	* [a] Laguna Laja	Biobío	37°23'74"	71°24'52"	1.020
3APO1A	* [a] Quilapo	Arauco	37°24'47"	73°33'74"	180
3IDA1A	* Caramávida	Arauco	37°33'58"	73°21'20"	235
3TRO1A	* [a] Trongol	Arauco	37°33'59"	73°21'17"	130
3CAÑ1A	* [a] Cañete	Arauco	37°37'49"	73°25'02"	160

(Continúa)

Accesión	Lugar	Provincia	Latitud sur	Longitud oeste	Altitud m.s.n.m.
3MAN1A	* [a] El Manzano	Malleco	37°47'45"	72°51'34"	560
3CON2A	* Contulmo	Arauco	38°03'58"	73°14'23"	640
3LOL2A	* Lolco	Cautín	38°07'45"	71°24'14"	750
3OYO1A	* Troyo	Cautín	38°09'50"	71°48'45"	760
3LON6A	* [a] Lonquimay	Cautín	38°21'02"	71°16'44"	840
3GAL2A	* [a] Galletué	Cautín	38°35'33"	71°26'12"	1.140
3PIN2A	* [a] Pino Hachado	Cautín	38°38'55"	70°57'07"	1.620
3SAA2A	* [a] Pto.Saavedra	Cautín	38°46'48"	73°16'13"	s/i
3NIM1A	* [a] Nueva Imperial	Cautín	38°45'81"	72°54'99"	90
3HAN1A	* [a] Chanquín	Valdivia	39°16'39"	73°11'38"	50
3NIG1A	* [a] Nigue	Valdivia	39°19'12"	73°11'53"	50
93PET1A	* [a] Petrohué	Osorno	41°08'	72°16'	s/i
2CPU2A	* Carelmapu	Llanquihue	41°48'S	73°47'O	4
94BAU1A	* Pelluhue	Cauquenes	35°48'S	72°14'20"	245
2FUT6A	* Futaleufú	Chiloé	43°08'S	71°48' O	366
2MAR1A	* [a] Puerto M. Balmaceda	Aisén	43°47'S	72°57'O	0
94CAY1A	* [a] Cayucupil	Arauco			
96 AMB1A	* [a] Ambato	Ecuador	01°01'	s/i	2.500
97PUR1A	* [a] Purén	-	s/i	S/i	s/i
92ILO1A	* [a] Iloca	Curicó	34°55'S	72°11'O	s/i
3BUC2A	* Buchupureo	Ñuble	36°05'25"	72°47'17"	226
3LLE1A	* [a] Los Lleuques	Ñuble	36°52'06"	71°35'87"	1.000
3LLI2A	* Llico	Arauco	37°11'89"	73°33'85"	10
3NAH7A	* [a] Nahuelbuta	Malleco	37°47'20"	72°59'59"	1.290
3ELI1A	* [a] Elicura	Arauco	37°48'19"	73°09'34"	325
3NIT1A	* [a] Nitrito	Cautín	38°07'54"	71°20'08"	805
3SIE1A	* [a] Sierra Nevada	Cautín	38°26'93"	71°22'80"	1.050
3GUI2A	* [a] Conguillío	Cautín	38°38'85"	71°38'15"	1.120
3LLA1A	* [a] Llaima	Cautín	38°41'24"	71°49'48"	1.200
3ICA7A	* [a] Lago Icalma	Cautín	38°43'22"	71°12'53"	1.120
3MEL5A	* [a] Conguillío	Cautín	38°45'94"	71°37'93"	750
3BUD1A	* [a] Lago Budi	Cautín	38°48'17"	73°23'43"	80
3CUN1A	* [a] Cunco	Cautín	38°51'06"	71°40'51"	410
3COR1A	* [a] Corral	Valdivia	39°56'21"	73°13'28"	s/i
3FLO1A	[a] Tres Chiflones	Valdivia	40°02'80"	73°10'49"	360
3ONO1A	* [a] Futrono	Valdivia	40°09'59"	72°35'16"	s/i
3RIÑ1A	[a] Riñinahue	Valdivia	40°17'74"	72°10'86"	80
3PUY5A	* [a] Puyehue	Osorno	40°43'60"	71°56'66"	1.290
3HUI1A	* Chaihuin	Valdivia	39°56'58"	73°34'23"	5
F. virginiana					
LH4	* Black Hills	EE.UU.	43°30'N	103°20'E	1.380
F. x *ananassa*					
SELVA	* Cv. comercial				
PÁJARO	* Cv. comercial				

s/i = sin información.
*Accesión analizada con isoenzimas. [a]Accesión analizada con AFLP.

polietilenglicol y ácido ascórbico (0,1%); polivinilpolipirrolidona). Para evitar la denaturación de las proteínas, el proceso de extracción se realizó a baja temperatura, colocando el mortero sobre hielo.

En cada muestra se colocó un papel filtro, para absorber el extracto crudo de la proteína. El extracto crudo restante fue filtrado y almacenado a –20 °C en caso de tener que repetir la evaluación.

Preparación del gel de almidón

Los geles de almidón (10%) fueron preparados el día anterior a la electroforesis. Los tampones usados fueron los siguientes: a) sistema discontinuo tris-citrato 0,05 M, pH 8,3 y litio-borato 0,22 M, pH 8,3; b) el sistema continuo, tris-citrato 0,18 M, pH 7,0; y c) histidina 0,065 M, pH 6,5.

El volumen total del gel fue de 370 mL; se vaciaron 80 mL del tampón en un kitasato de 1.000 mL para mantener el almidón en suspensión. Los 290 mL restantes se calentaron hasta ebullición y fueron agregados al kitasato, el cual fue agitado vigorosamente. Una vez homogeneizada la mezcla se extrajo el aire mediante vacío y la mezcla fue vaciada en la cámara electroforética. El gel se dejó solidificar a temperatura ambiente y se cubrió con plástico para evitar deshidratación (Arulsekar *et al.*, 1981).

Electroforesis

A los geles se les realizó un corte transversal a 4 cm del borde (origen de migración), en el cual se colocaron los filtros embebidos en el extracto crudo de la proteína. En cada extremo del corte se colocaron filtros con azul de bromofenol como indicador.

El proceso de la electroforesis se realizó en refrigerador a 4 °C con 150 V en un período inicial de 1 hora hasta la elución de las proteínas en el gel. Posteriormente, se sacaron los filtros y se continuó con la electroforesis usando 300 V constante, hasta que el azul de bromofenol alcanzó 10 cm de migración desde el origen. Terminada la electroforesis los geles se laminaron para ser sometidos a la tinción histológica. Los geles teñidos fueron fijados en 50% de glicerol para su evaluación.

Durante la evaluación se midió la distancia de migración desde el origen (cm) de las bandas nítidas y reproducibles.

Sistemas isoenzimáticos

Las 84 accesiones de *Fragaria chiloensis* L. Duch. fueron evaluadas para los siguientes sistemas isoenzimáticos:

Aspartato amino tranferasa (AAT; EC.2.6.1.1); diaforasa (DIAP; EC.1.6.4.3); esterasa (EST; EC.3.1.1.1.1); 6-fosfo-glucodehidrogenasa (6PGD; EC.1.1.1.44); fosfo-glucosa isomerasa (GPI; EC.5.3.1.9); leucina aminopeptidasa (LAP; EC.4.11.1); enzima málica (ME; EC.1.1.1.40); malato dehidrogenasa (MDH; EC.1.1.1..37) y peroxidasa (PXR; EC.1.11.1.7), estos sistemas enzimáticos fueron evaluados con el sistema discontinuo tris-citrato-litio-borato, pH 8,1. Fosfoglucomutasa (PGM; EC.2.7.5.1) fue evaluada con el sistema continuo de tris-citrato, pH 7,0. Mientras que los sistemas shikimato dehidrogenasa (SKDH; EC.1.1.1.25) y fosfatasa ácida (ACP; EC.3.1.3.2) fueron evaluados bajo el tampón histidina, pH 6,5.

Análisis molecular (AFLP)

Para el análisis de AFLP, se aisló ADN de 61 accesiones de *Fragaria chiloensis* (Cuadro 1), usando hojas jóvenes y sanas, de acuerdo al protocolo descrito por Becerra y Gepts (1994). La metodología de AFLP se realizó mediante al protocolo de Vos *et al.* (1995), adaptado para trabajo no radioactivo. Se utilizaron seis combinaciones de partidores de AFLP: *Eco*RI-AGC/*Mse*I-CTG; *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CAG; *Eco*RI-ACC/*MseI*-CAA; *Eco*RI-ACC/*Mse*I-CAT; *Eco*RI-ACT/*Mse*I-CAC y *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTT.

Digestión de ADN genómico. La digestión de ADN se realizó en un volumen de reacción de 25 µL con una concentración de ADN de 250 ng), 5x de tampón de reacción; 1 unidad (u) de cada enzima de restricción (*Eco*RI y *Mse*I) y agua destilada. La reacción fue mezclada e incubada a 37 °C por 2 h.

Ligación de los adaptadores. La reacción de ligación de adaptadores se realizó con los 25 µL de ADN digerido, 24 µL de solución de ligamiento de adaptadores y 1 µL de ADN ligasa T4, incubándose a 20 °C por 2 h.

Reacción de Pre-amplificación (ADN+1). Se diluyó la mezcla digerida con los adaptadores ligados en una proporción de 1:10 con el tampón TE pH 8,0. La reacción de pre-amplificación se realizó con 5 µL (ADN 1:10), 40 µL de partidores de pre-amplificación, 5x de tampón de PCR para AFLPs y 1 u de *Taq* ADN polimerasa. Esta reacción fue amplificada bajo las siguientes condiciones: 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 60 s. El producto de la amplificación fue verificado en un gel de agarosa. El ADN+1 amplificado se diluyó en una proporción 1:50 en el tampón TE pH 8,0 (Vos *et al.*, 1995).

Amplificación selectiva. Se prepararon dos mezclas, la primera de ellas contuvo 0,5 µL del partidor *Eco*RI (+3) y 4,5 µL del partidor *Mse*I (+3), lo que dio un volumen de 5 µL. La segunda mezcla incluyó 1x tampón de PCR, 1 u de *Taq* ADN polimerasa y se completó un volumen de 10 µL con agua estéril. Ambas se mezclaron con 5 µL de ADN+1 (diluído). Esta reacción se amplificó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, y 25 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 60 s. Al producto amplificado se le agregó tampón de carga y desnaturalizó a 90 °C por 3 min, manteniéndose las muestras en hielo hasta cargar el gel (Vos *et al.*, 1995).

Electroforesis. La separación de los productos amplificados se realizó en un gel de acrilamida al 6% (Acrilamida, Urea, 10xTBE), temed y persulfato de amonio 10%. El gel se dejó polimerizar 2 h y la electroforesis se realizó con el tampón 1xTBE a 1800 V y 50 °C. La tinción del gel se realizó con nitrato de plata y se secó para la evaluación y registro de las bandas mediante el uso de un escáner (Vos *et al.*, 1995).

Análisis de los datos

Los fenotipos isoenzimáticos fueron evaluados por la distancia de migración de las bandas desde el origen.

Los *loci* observados en AFLPs fueron analizados cualitativamente, por presencia o ausencia de las bandas, mediante el programa de computación NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate System), versión 1.70 (Rohlf, 1992). La matriz de similitud genética calculada fue utilizada para el análisis de agrupamiento, mediante el uso del método "no balanceado de pares con media aritmética" (UPGMA) (Rohlf, 1992).

RESULTADOS

Sistemas enzimáticos evaluados

Los sistemas DIAP, 6PGD, MDH, SKDH, AAT, EST, ME y PER a pesar de diversos ensayos de optimización, presentaron una zona de tinción poco consistente por lo cual se eliminaron del estudio. Por el contrario, los sistemas enzimáticos GPI, LAP y PGM presentaron bandas nítidas y consistentes. Por lo tanto, sólo estos tres sistemas fueron incluidos en la evaluación de los clones seleccionados.

La fosfoglucomutasa isomerasa (GPI) generó dos patrones, con tres zonas de actividad. La accesión LH4, *F. virginiana* presentó las cinco plantas con tres bandas, la primera a 2,9 cm desde el origen, la segunda a 3,5 cm y la tercera a 5 cm. El resto de las accesiones (*F. chiloensis* y *F. ananassa*) presentaron la primera banda a 3,1 cm, la segunda a 3,5 cm y la tercera a 5 cm desde el origen (Figura 1a).

La leucina aminopeptidasa (LAP) también presentó dos patrones con una banda única a 6,7 ó 7,0 cm de migración desde el origen (Figura 1b). La accesión 96AMB 1A presentó el primer patrón de la banda ubicada a 6,7 cm, el resto de las accesiones fueron monomórficas para el segundo patrón.

En contraste, la fosfoglucomutasa (PGM) fue monomórfica y presentó un patrón con dos zonas de actividad. La primera se ubicó a 3 cm y la segunda una doble banda a 3,9 y 4,1 cm desde el origen (Figura 1c).

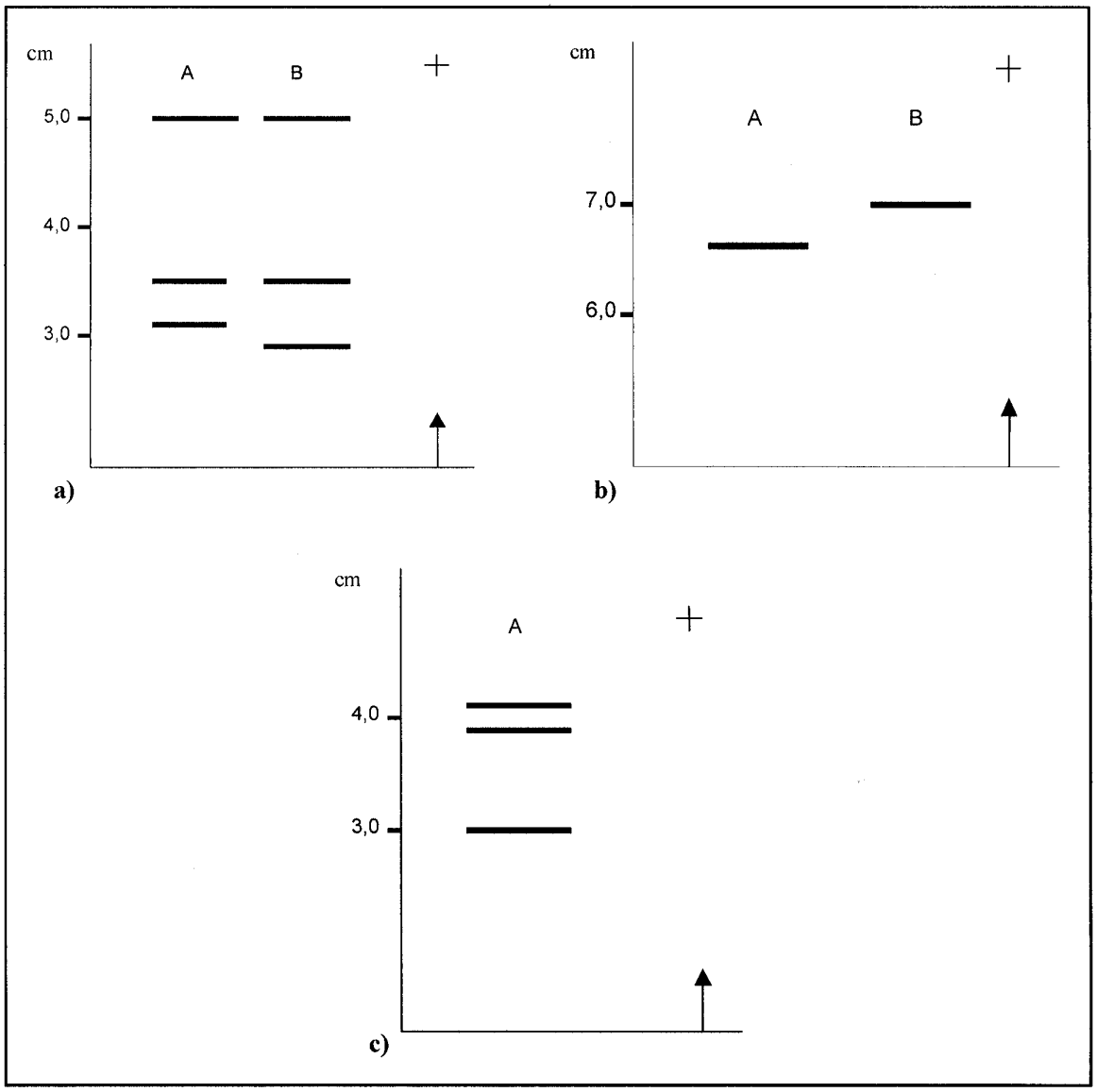

Figura 1. Zimogramas para a) fosfoglucosa isomerasa (GPI), b) leucina aminopeptidasa (LAP), y c) fosfoglucomutasa (PGM).

Figure 1. Zymograms for a) phosphoglucomutase isomerase (GPI), b) leucine aminopeptidase (LAP), and c) phosphoglucomutase (PGM).

Niveles de polimorfismo detectado por AFLP

Las combinaciones de partidores de AFLP usados en este estudio detectaron un total de 127 bandas, de las cuales 71% fueron monomórficas y sólo 29% fueron polimórficas (Cuadro 2).

Las combinaciones de partidores utilizados presentaron diferentes grados de eficiencia en la detección de polimorfismo. Es así como la combinación *Eco*RI-ACC/*Mse*I-CAT presentó la menor eficiencia, ya que sólo detectó tres *loci* polimórficos (8%), en cambio, la combinación *Eco*RI-ACT/*Mse*I-CAC fue la más eficiente al detectar el 46% del total de *loci* polimórficos (Cuadro 2, Figura 2). Las combinaciones *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CAG, *Eco*RI-ACC/*Mse*I-CAA y *Eco* RI-AGG/*Mse*I-CTT fueron menos eficientes que las antes mencionadas, ya que cada una detectó sólo un 11% de *loci* polimórficos (Cuadro 2).

Análisis de similitud genética mediante AFLP

El análisis genético de las seis combinaciones de partidores de AFLP detectó un rango de similitud genética que varió entre un 45 y un 100% entre las accesiones evaluadas (Datos no mostrados).

Estos datos agruparon a las 61 accesiones en cuatro grupos (Figura 3). El primero de ellos incluyó a 51 accesiones (84%), con un nivel de similitud de 100% de acuerdo a los partidores evaluados; estas accesiones fueron colectadas en una amplia distribución geográfica, desde la provincia de Talca (VII Región) hasta General Carrera (XI Región). El segundo grupo está constituido por 6 genotipos (10%) con una similitud de alrededor del 86%, distribuidas desde la provincia de Malleco (IX Región) hasta Valdivia (X Región). El tercer grupo formado sólo por 2 genotipos (3%), con un nivel de similitud aproximado de 83%, procedentes de Cautín (IX Región) y Chiloé (X Región). El cuarto grupo de 2 accesiones (3%) con una similitud del 78%, procedentes de Cautín (IX Región) y Valdivia (X Región).

En general, no se observó una tendencia a agrupar genotipos de una misma región geográfica. Por ejemplo, los ecotipos 2BRA1A y 3LON6A provenientes de las provincias de Chiloé, X Región, y Cautín, IX Región, respectivamente, al igual que las accesiones 3LLA1A y 3NIE1A provenientes de las provincias de Cautín, IX Región, y Valdivia, de la X Región. Este efecto se observa también con la accesión 96AMB1A proveniente de Ecuador, que se agrupó con las 50 accesiones de *Fragaria chiloensis* colectadas en Chile que presentaron un nivel de similitud de 100%.

Cuadro 2. Número de bandas y polimorfismo detectados por seis combinaciones de partidores de amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP) en 61 accesiones de *Fragaria chiloensis* L. Duch

Table2. Number of bands and polymorphism detected by six amplified fragment length polymorphism (AFLP) primer combinations on 61 *Fragaria chiloensis* L. Duch

Combinación de partidores	N° total de bandas	N° bandas monomórficas	N° bandas polimórficas	N° patrones
*Eco*RI-AGC/*Mse*I-CTG	23	18	5	6
*Eco*RI-ACA/*Mse*I-CAG	16	12	4	5
*Eco*RI-ACC/*Mse*I-CAA	27	23	4	4
*Eco*RI-ACC/*Mse*I-CAT	15	12	3	5
*Eco*RI-ACT/*Mse*I-CAC	27	10	17	25
*Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTT	19	15	4	6
	127	90	37	

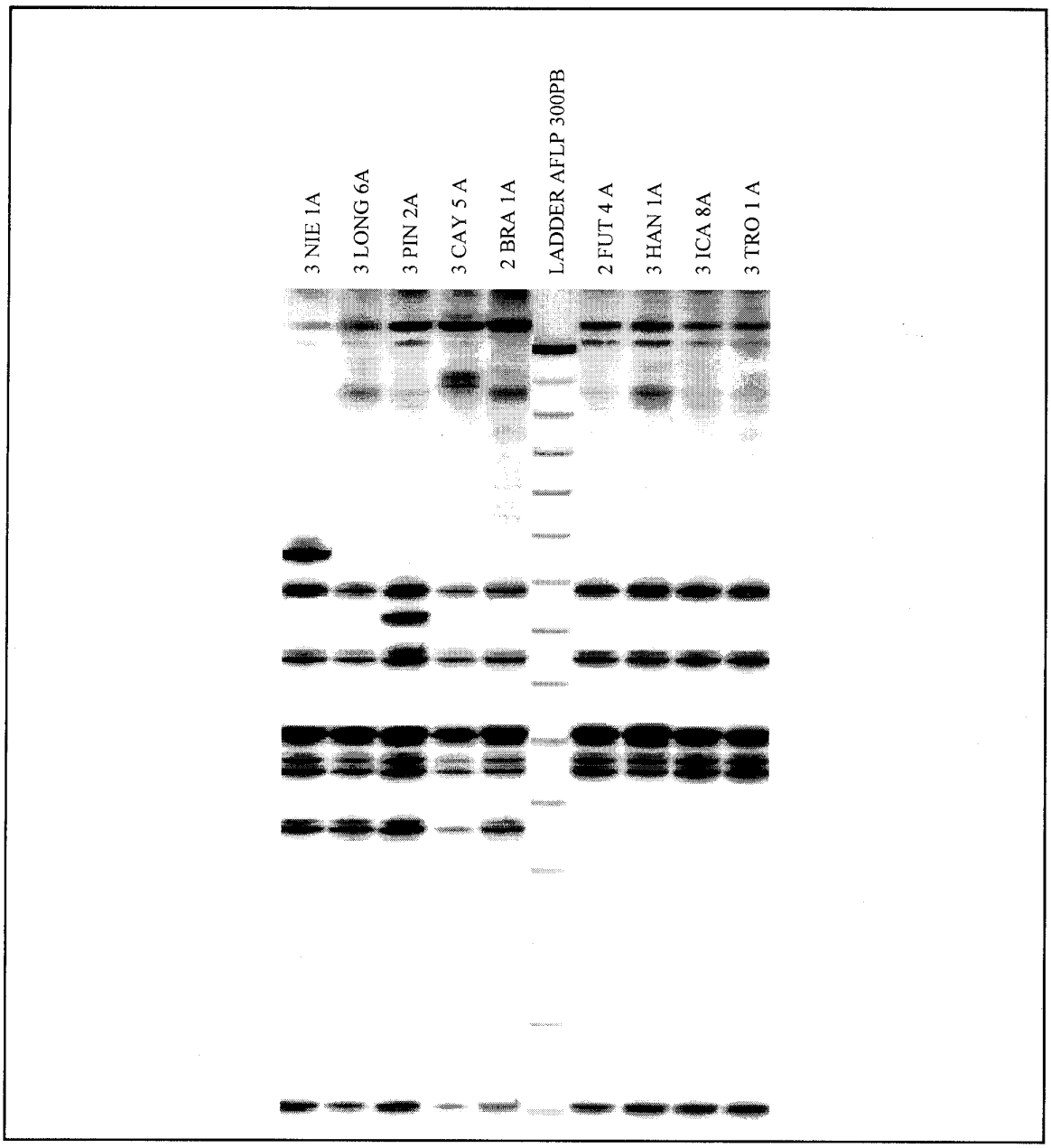

Figura 2. Patrones de AFLP generados por la combinación de partidores *Eco*RI-ACT/ *Mse*I-CAC.
Figure 2. AFLP banding pattern for *Eco*RI-ACT/ *Mse*I-CAC primer combination.

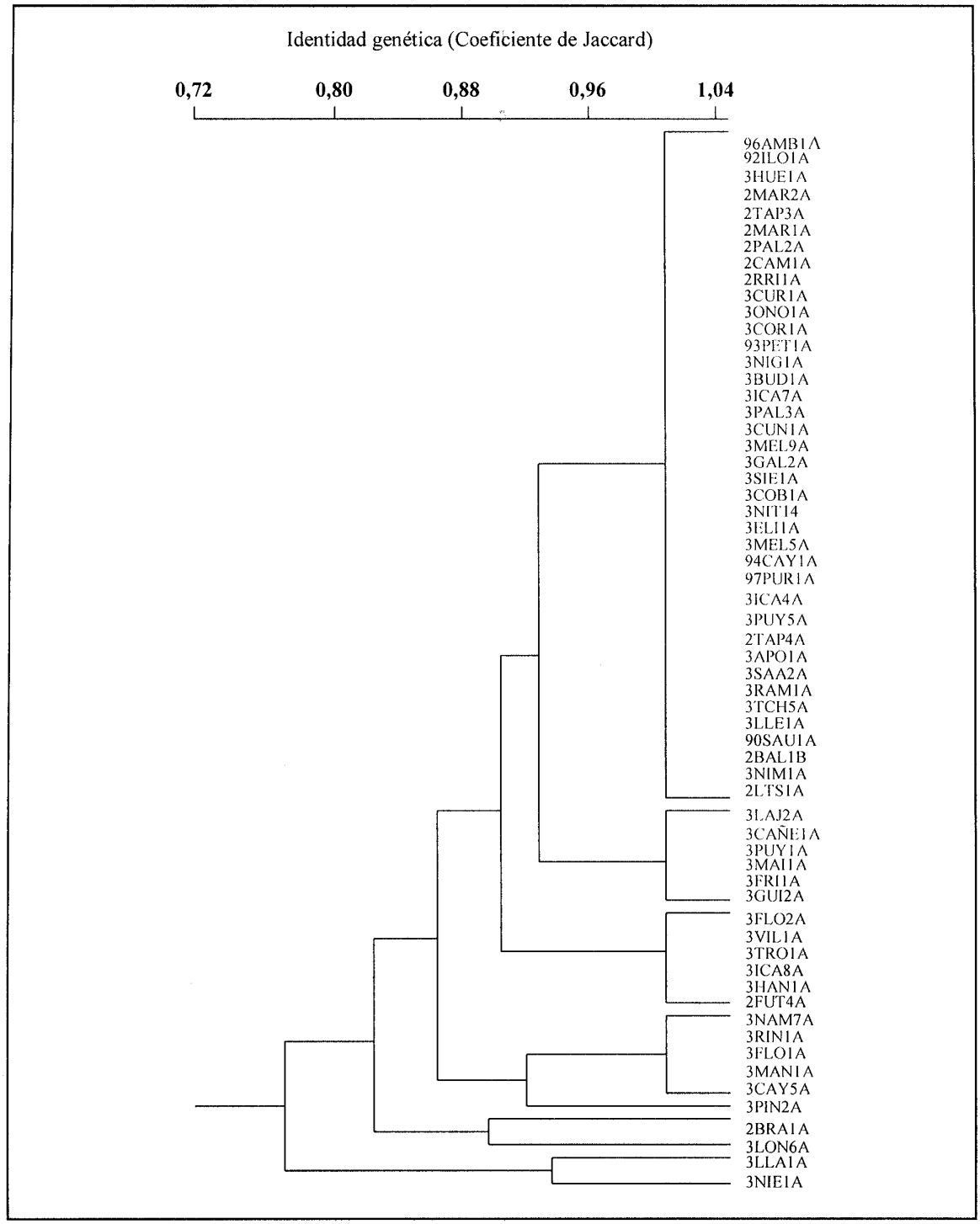

Figura 3. Relaciones genéticas entre genotipos de *Fragaria chiloensis* L. Duch. mediante seis combinaciones de partidores de amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP).

Figure 3. Genetic relationships among *Fragaria chiloensis* L. Duch. genotypes using six primers combinations of amplified fragment lenght polymorphism (AFLP).

DISCUSIÓN

Los niveles de diversidad genética detectados en las accesiones analizadas en este estudio mediante isoenzimas y AFLP son bajos, considerando que estos genotipos fueron seleccionados por diferentes características morfo-agronómicas, y que además provienen de diferentes hábitats y regiones geográficas. Esta baja diversidad genética concuerda con lo obtenido previamente en los mismos genotipos mediante RAPD (Becerra *et al.*, 2001) y con otro estudio de RAPD que incluyó accesiones de *Fragaria chiloensis* provenientes de América del Norte y Sur (Porebski y Catling, 1993).

El uso de diferentes sistemas enzimáticos en frutilla indicó que sólo tres sistemas funcionaron adecuadamente. Estos sistemas proporcionaron resultados claros y consistentes a través de todo el estudio. Esta situación concuerda con resultados previos donde se utilizaron los sistemas GPI, PGM y LAP para describir o identificar variedades por su nitidez y estabilidad (Bringhurst *et al.*, 1981; Arulsekar *et al.*, 1981; Nehra *et al.*, 1991; Greco y Martelli, 1993; Bell y Simpson, 1994). Por otra parte, Bell y Simpson (1994) mencionaron un buen número de otros sistemas enzimáticos que no se pueden usar en forma adecuada en la caracterización de germoplasma, ya que no se pueden detectar sus productos o éstos son muy inestables.

La evaluación de las isoenzimas se basó en las observaciones de los alelos presentes en los genotipos analizados. Los resultados obtenidos indicaron una escasa variación isoenzimática con los sistemas utilizados. Hasta ahora no existían datos de variabilidad genética isoenzimática de *F. chiloensis* presente en Chile. La baja diversidad genética observada en la frutilla chilena en relación a la obtenida en otros estudios de frutilla comercial, puede deberse a que esta última es altamente heterocigota (Hancock y Luby, 1993) como producto del cruzamiento de *F. chiloensis* y *F. virginiana*, por lo tanto, es factible esperar una mayor diversidad genética a nivel bioquímico que en relación a uno de los padres. Otra posible explicación es que exista una baja diversidad enzimática *per se* en el material de frutilla chilena. En este sentido se postula que el origen de la frutilla chilena podría haber sido producto de la migración de las aves de Norte América (Hancock *et al.*, 1999), lo cual podría corresponder a sólo una proporción de la diversidad genética de las poblaciones norteamericanas en la frutilla chilena. Esto es apoyado por ocho patrones de bandas obtenidos con GPI en *F. chiloensis* de Norte América (Arulsekar *et al.*, 1981), comparado con un único patrón obtenido en este estudio.

La menor diversidad genética de la frutilla chilena, comparada con la norteamericana también puede deberse a que esta última tiene mayores posibilidades de cruzarse con otras especies silvestres presentes en algunos sectores de esa zona, ya que en su distribución geográfica *F. virginiana* y *F. chiloensis* están bastante cercanas (Bringhurst y Ahman, 1963; Luby *et al.*, 1992). En este aspecto, es posible encontrar poblaciones híbridas de F. *chiloensis* y *F. virginiana* desde las islas de Vancouver hasta California, proceso que disminuye a medida que se avanza hacia el sur, y donde la presencia de las características de *F. chiloensis* decrecen paulatinamente (Staudt, 1989).

Un estudio en que se comparó la diversidad genética de una muestra de germoplasma de frutillas de Norte América y Sur América (Chile) a través de RAPDs, confirmó la mayor diversidad genética del germoplasma norteamericano de frutilla, en comparación con el germoplasma chileno, representado en sus coeficientes de similitud de 65 y 92%, respectivamente (Porebski y Catling, 1993).

Un análisis de RAPD con 60 partidores, realizado en las 61 accesiones utilizadas en este estudio, indicó una diversidad genética baja. El 90% de las accesiones estudiadas tuvo un nivel de similitud promedio de 90%. En este estudio tampoco se observó una agrupación directa entre las accesiones y su lugar de colecta o zona agroecológica (Becerra *et al.*, 2001). Estos datos mole-

culares contrastan con los obtenidos por Hinrichsen *et al.* (1999), quienes detectaron un valor promedio de similitud genética cercano a 50%, utilizando 16 partidores informativos, además de una cierta correlación entre marcadores y la distribución geográfica.

Los bajos niveles de diversidad genética detectados por los tres sistemas enzimáticos (GPI; PGM y LAP), RAPD y AFLP, contrastan con la gran diversidad de características morfológicas del mismo germoplasma, en forma, tamaño, y color de la hoja; largo de los pecíolos; densidad de tricomas; tamaño de los pétalos; grosor y longitud de los estolones; características del fruto, como forma (desde redondos hasta cónicos), color (desde rojos a blancos) y peso (superior a 4 g). También el grado de sabor y aroma, tolerancia a insectos y enfermedades, producto de su adaptación a una gran cantidad de ambientes (Hancock, 1990; Cameron *et al.*, 1993; Domínguez, 1995). Una diversidad morfológica y agronómica similar fue detectada en un estudio realizado en poblaciones diploides de *F. vesca* (Hankock y Bringhurst, 1978) y octoploides de *F. chiloensis* y *F. virginiana* (Hankock y Bringhurst, 1979) colectadas en California.

Para maximizar el progreso genético de un programa de mejoramiento genético de frutilla, en el corto y largo plazo, es importante contar con una población de cruzamiento inicial que posea una amplia base genética, para lo cual es indispensable usar padres con características adecuadas (morfológicas, agronómicas y moleculares), provenientes de diversos orígenes. De esta manera se puede reducir la consanguinidad y la pérdida de genes favorables por deriva genética (Sjulin y Dale, 1987).

En este sentido ha sido documentada la estrecha base genética de los cultivares comerciales de frutilla norteamericanos. Por ejemplo, sólo un escaso número de clones (Sjulin y Dale, 1987) y citoplasmas diferentes (Dale y Sjulin, 1990; Harrinson *et al.*, 1997) han participado en la producción de los 134 cultivares norteamericanos durante los últimos 30 años. Por otra parte, los 20 cultivares más importantes de Norte América provienen de 38 clones fundadores, de los cuales sólo siete son responsables por aproximadamente el 50% de la contribución genética (Galleta y Maas, 1990).

Para evitar el problema mencionado anteriormente, un programa de mejoramiento genético de frutilla debe considerar la mantención de una diversidad genética alta. Este objetivo podría lograrse usando algunas de las siguientes estrategias: a) desarrollo de frutillas sintéticas octoploides; b) selección e incorporación de clones de las colecciones de *F. chiloensis*; c) selección e incorporación de *F. virginiana* (Dale *et al.*, 1993); d) aumentar el número de padres por generación, con un sistema de control parental en las hibridaciones; e) introducción de material parcialmente o no relacionado con *F.* x *ananassa*; y f) introducir germoplasma no mejorado mediante el uso de especies silvestre (Sjulin y Dale, 1987). El material evaluado en este trabajo cumple con varias características deseadas, por lo que podría servir de base para iniciar este programa.

Los métodos utilizados para lograr los objetivos del mejoramiento pueden ser varios dependiendo del factor limitante (carácter cualitativo o cuantitativo) que se desea mejorar: Por ejemplo, retrocruzas (Dale *et al.*, 1993), reconstitución de *F.* x *ananassa* usando *F. chiloensis* y *F. virginiana* (Dale *et al.*, 1993; Hancock *et al.*, 1993), y uso de selección recurrente (Hancock *et al.*, 1993).

La reconstitución de la especie tiene algunas limitaciones: a) un efecto maternal de *F. virginiana*, el que inactiva los genes que controlan el desarrollo de los órganos masculinos de *F. chiloensis*, efecto que dura aún después de cuatro retrocruzas, y b) el uso de clones de *F. chiloensis* de fruto grande (Staudt, 1997) para no perder el tamaño del fruto. Frente a este problema se recomienda seleccionar clones con características hortícolas adecuadas de ambos padres e incorporar estas características directamente en los stocks genéticos de *F.* x *ananassa* (Staudt, 1997).

Debido a que muchas de las características a mejorar en frutilla son controladas cuantitativamente (Bringhurst, 1990), el uso de un método de selección recurrente podría ayudar a incrementar la frecuencia de alelos favorables introducidos desde las especies silvestres (Hancock *et al.*, 1999). Este sistema es más lento y requiere un mayor número de generaciones de selección, comparado con el de retrocruzas, pero puede proveer un continuo mejoramiento de las características deseadas por muchas generaciones (Sjulin y Dale, 1987).

El incremento del número de padres por generación reduce la tasa de consanguinidad y minimiza la pérdida de diversidad por la deriva genética. La diversidad genética se puede aumentar incorporando materiales escasamente emparentados, por ejemplo, de otras zonas o regiones y/o mediante la introducción de material silvestre, incluyendo material diploide y tetraploide. Algunos de los clones utilizados hasta ahora en los programas de mejoramiento son: Ambato (*F. chiloensis* de Ecuador), Reedsport y 2nd Pacific Northwest (*F. chiloensis* norteamericano), y cuatro clones de *F. virginiana glauca* (Alaska 292, PI 36979, un clon de Utah y otro de Oregon). Todos estos clones, con excepción de Alaska 292, han sido usados en programas de retrocruzas, usando el material cultivado como padre recurrente, por lo tanto, la contribución del material silvestre al cultivado ha sido muy reducida (Sjulin y Dale, 1987).

A pesar del éxito de la transferencia de genes de material silvestre en cruzas recurrentes, por ejemplo tolerancia a frío e insensibilidad al fotoperíodo desde *F. virginiana*, el uso de *F. chiloensis* podría ser más extensivo, pero usando material diverso de otras regiones geográficas (Crock *et al.*, 1982).

CONCLUSIONES

El número de bandas generadas en AFLP en la amplificación +3 de los partidores seleccionados generaron un número de *loci* considerado bajo ya que una de las mayores ventajas de esta técnica es el gran número de *loci* por combinación de partidores. Probablemente el diseño de partidores +2 contribuiría a aumentar la detección de un mayor número de *loci* en *Fragaria chiloensis*.

Al comparar la similitud genética máxima de 80%, detectada por 60 partidores de RAPD (352 bandas) y la generada por seis combinaciones de partidores de AFLP de 78% (127 bandas), se corroboró la baja diversidad genética de los genotipos analizados. Se verificó además, la mayor efectividad de la técnica de AFLP comparada con los RAPD.

LITERATURA CITADA

Arulsekar, S., R. Bringhurst, and V. Voth. 1981. Inheritance of PGI and LAP isoenzymes in octoploid cultivated strawberries. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 106:679-683.

Becerra, V., and P. Gepts. 1994. RFLP diversity of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. Genome 37:256-263.

Becerra, V., C. González, M. Paredes, y A. Lavín. 2001. Caracterización molecular de 62 posibles progenitores de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. para un programa de mejoramiento. AgroCiencia (en prensa).

Bell, J., and D. Simpson. 1994. The use of isoenzyme polymorphisms as an aid for cultivar identification in strawberry. Euphytica 77:113-117.

Bringhurst, R. 1990. Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. HortScience. 25:879-881.

Bringhurst, R., and D. Ahman. 1963. Natural pentaploid *Fragaria chiloensis* - *F. vesca* hybrids in coastal California and their significance in polyploid *Fragaria* evolution. Am. J. Bot. 50: 658-661.

Bringhurst, R., S. Arulsekar, J. Hankock, and V. Voth. 1981. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci. 106:684-687.

Cameron, J., T. Sjulin, J. Ballington, C. Shanks, C. Muñoz, and A. Lavín. 1993. Exploration, collection and evaluation of Chilean *Fragaria*: Summary of 1990 and 1993 expeditions. Acta Hortic. 348:65-74.

Dale, A., H. Daubeny, M. Luffman, and A. Sullivan. 1993. Development of *Fragaria* germplasm in Canada. Acta Hortic. 348:75-80.

Dale, A., and T. Sjulin. 1990. Few cytoplasms contribute to North American strawberry cultivars. HortScience 25:1341-1342.

Galleta, G., and J. Maas. 1990. Strawberry genetics. HortScience 25:871-879

Greco, I., and G. Martelli. 1993. Isoenzymatic characterization of strawberry clones in Southern Italy. Acta Hortic. 345:21-27.

Harrison, R., J. Luby, and G. Furnier. 1997. Chloroplast DNA restriction fragment variation among strawberry (*Fragaria* spp.) Taxa. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 122:63-68.

Hancock, J. 1990. Ecological genetics of natural strawberry species. HortScience 25:879–881.

Hancock, J., and R. Bringhurst. 1978. Interpopulational differentiation and adaptation in the perennial diploid species *Fragaria vesca* L. Amer. J. Bot. 65:795-803.

Hancock, J., and R. Bringhurst. 1979. Ecological differentiation in perennial, octoploid species of *Fragaria*. Am. J. Bot. 66:367-375.

Hancock, J., and J. Luby. 1993. Genetic resources at our doorstep: the wild strawberries. BioScience 43:141-147.

Hancock, J., P. Callow, and D. Shaw. 1994. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry, *Fragaria* x *ananassa*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 119:862-864.

Hancock, J., A. Dale, and J. Luby. 1993. Should we reconstitute the strawberry?. Acta Hortic. 348: 86-93.

Hancock, J., A. Lavín, and J. Retamales. 1999. Our Southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. HortScience 34:814-816.

Hill, M., H. Witsenboer, M. Zabeau, P. Vos, R. Kesseli, and R. Michelmore. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. Theor. Appl. Genet. 93:1202-1210.

Hinrichsen, P., J. Kuncar, M. Hirai, C. Muñoz, y A. Lavín. 1999. Diversidad genética de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. determinada mediante RAPD (Random amplified polymorphic DNA). Agricultura Técnica (Chile) 59:151-168.

Luby, J., J. Hancock, and J. Ballington. 1992. Collection of native straberry germplasm in the Pacific Northwest and Northern Rocky Mountains of United States. HortScience 27:12-17.

Morrow, E., and G. Darrow. 1952. Effects of limited inbreeding in strawberries. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 59:269-276.

Nehra, N., K. Kartha, and S. Stushonff. 1991. Isozymes as markers for identification of tissue culture and greenhouse-grown strawberry cultivars. Can. J. Plant Sci. 71:1195-1201.

Porebski, S., and P. M. Catling. 1993. RAPD analysis of the relationship of North and South American subspecies of *Fragaria chiloensis*. Can. J. Bot. 76:1812-1817.

Rohlf, F. 1992. NTSYS – pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.70. Exeter Publications, New York, USA.

Senanayake, Y., and D. Bringhurst. 1967: Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. Am. J. Bot. 54:221-228.

Sharma, S.K., M. Knox, and T. Ellis. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93: 751-758.

Sjulin, T., and A. Dale. 1987. Genetic diversity of North American strawberry cultivars. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 112:375-385.

Staudt, G. 1989. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. Acta Hortic. 265:23-33.

Staudt, G. 1997. Reconstitution of *Fragaria* x *ananassa*: The effect of *Fragaria virginiana* cytoplasm. Acta Hortic. 439:55-62.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van De Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kupier, and M. Zabeau. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.