



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Magíster en Ciencias Forestales

**Análisis de la diversidad genética, estructura genética y desequilibrio
de ligamiento en *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis***

FELIPE ALBERTO OÑATE CARVAJAL

CONCEPCIÓN - CHILE

2016

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Forestales

Profesor Guía: Carlos Figueroa Lamas

Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales

Universidad de Concepción

**Análisis de la diversidad genética, estructura genética y desequilibrio de ligamiento
en *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis***

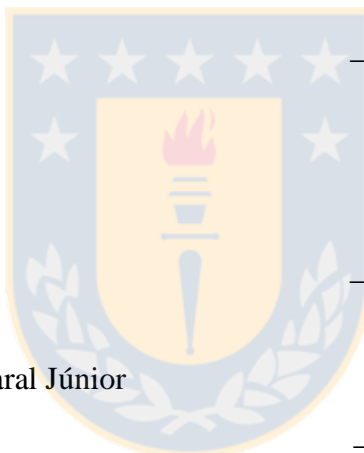
Comisión Evaluadora:

Carlos Figueroa Lamas
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Rodrigo Hasbún Zaror
Ingeniero Forestal, Dr.

Freddy Mora Poblete
Ingeniero Forestal, Dr.

Antônio Teixeira do Amaral Júnior
Ingeniero Agronomo, Dr.



Directora de Postgrado:

Regis Teixeira Mendonça
Ingeniero Químico, Dr.

Decano facultad de Ciencias Forestales

Manuel Sánchez-Olate
Ingeniero Forestal, Dr.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, por todo el apoyo y confianza que pusieron en mí. Aun cuando no entendiesen del todo los procesos que viví, siempre estuvieron allí para mí.

A mis profesores, el Dr. Carlos Figueroa y el Dr. Freddy Mora, quienes me asistieron a lo largo de la larga travesía que fue el proyecto de investigación, por incentivar me al pensamiento crítico, a la autonomía en la investigación, y darme la libertad para poder desarrollar mis habilidades a un ritmo propio.

Al Dr. Rodrigo Hasbún, mi co-guía, quien me permitió trabajar y me asistió en toda mi estadía en el Laboratorio de Epigenética Vegetal, por siempre estar disponible para discutir dudas, compartir conocimiento, y sacarme de los apuros que se dan al trabajar en un laboratorio, y por entregarme una valiosa visión más global del proyecto de investigación en el cual participé.

A Anthar Sanchez, mi pareja, mi compañera en días y noches de trabajo, por su comprensión, cariño, y paciencia, por estar conmigo cuando más falta me hizo, por aguantar mis traspasos, mis malos momentos, y siempre darme una palabra de aliento cuando ya no daba más.

A Marcelo, a Misael, a Ignacio, que sin tener la responsabilidad, me asistieron en las largas jornadas de trabajo, por acompañarme, y hacer que el trabajo fuese una gran experiencia de aprendizaje.

A mis colegas del Laboratorio de Epigenética Vegetal, por sus oportunos consejos, la grata compañía y hacer que nuestro entorno de trabajo fuese como ninguno otro en la universidad.

A mis compañeros de postgrado, a Cristina, a Andrés, a Javiera, que siempre estuvieron allí conmigo, para compartir los buenos y malos momentos y para compartir una palabra de apoyo.

Esta memoria de título fue financiada por el Proyecto Anillo ACT-1110 del Programa de Investigación Asociativa de CONICYT.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 El género <i>Fragaria</i>	3
3.1.1 Taxonomía del género <i>Fragaria</i>	3
3.1.2 La frutilla nativa chilena	4
3.1.3 <i>F. Chilensis</i> como modelo de estudio de maduración de frutos.....	6
3.2 Diversidad genética, Estructura poblacional y desequilibrio de ligamiento en especies del género <i>Fragaria</i>	7
3.2.1 Marcadores moleculares y sus estudios en el género <i>Fragaria</i>	7
3.2.2 Diversidad genética en poliploides del género <i>Fragaria</i>	8
3.2.3 Desequilibrio de ligamiento en especies del género <i>Fragaria</i>	10
IV. METODOLOGÍA.....	13
4.1 Material vegetal	13
4.2 Extracción de ADN.....	17
4.3 Marcadores SSR.....	17
4.4 Estandarización de Protocolo de PCR Multiplex-Ready	19
4.5 Evaluación de marcadores en el banco de germoplasma	20
4.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	21
4.7 Diversidad genética.....	22
4.8 Estructura genética.....	22
4.9 Desequilibrio de ligamiento	23
5.1 Extracción de DNA.....	25
5.2 Optimización del protocolo de PCR multiplex-ready.....	26
5.3 Evaluación de marcadores en el banco de germoplasma	29
5.4 Estadísticos de diversidad genética.....	31
5.5 Análisis de estructura poblacional	31
5.5.1 Detección de loci bajo selección.....	31
5.5.2 Análisis de estructura genética.....	32
5.5.3 Estadísticos de diversidad genética para los grupos genéticamente diferenciados	35

5.6	Desequilibrio de ligamiento	35
VI.	DISCUSIÓN	37
6.1	Optimización del protocolo de PCR Multiplex-Ready	37
6.2	Estadísticas de los marcadores microsatélite	38
6.3	Análisis de estructura genética.....	39
6.4	Desequilibrio de ligamiento	40
VII.	CONCLUSIÓN	43
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	44
IX.	APÉNDICE.....	62



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	PÁGINA
<u>En el texto</u>	
1. Lista de las accesiones de <i>F. chilensis</i> utilizadas, código, región climática, población putativa y ubicación geográfica. Las abreviaciones MTM, FCM, HPM, CM y PAT corresponden a sus respectivas regiones climáticas, según lo descrito por Lavín <i>et al.</i> (2000).....	14
2. Lista de los 39 marcadores SSR utilizados en el estudio, incluyendo sus respectivos partidores, las referencias bibliográficas desde las cuales se obtuvieron y el grupo de ligamiento en el que aparecen en el mapa de ligamiento de Sargent <i>et al.</i> (2012) o en el mapa de QTL de Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i> (2011a).....	18
3. Concentraciones óptimas para los partidores específicos y fluoróforos asignados para usar en las reacciones de PCR multiplex-ready para cada uno de los 39 marcadores en el estudio.....	27
4. Resumen de estadísticos de la variación genética de las 54 accesiones de <i>F. chilensis</i> utilizando las 259 bandas producidas por los 38 marcadores SSR. Las abreviaciones MT, MF, HP y P representan Mediterráneo templado y marino, marino fresco, marino húmedo patagónico, Mediterráneo frío, y polar alpino tundra, respectivamente, según las regiones climáticas descritas por Lavín <i>et al.</i> (2000).....	31
5. Resumen de estadísticos de la variación genética de las 54 accesiones de <i>F. chilensis</i> utilizando las 259 bandas producidas por los 38 marcadores SSR, en los grupos genéticos predichos por el análisis de STRUCTURE.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

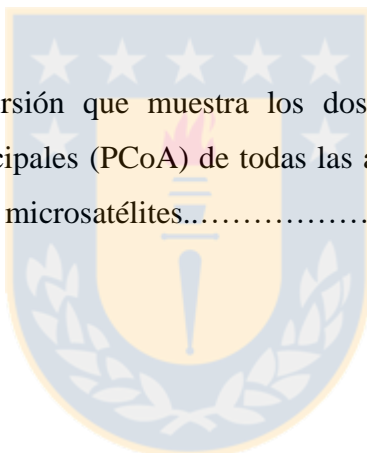
FIGURA N°	PÁGINA
En el texto	
1. Mapa de las accesiones de <i>F. chilensis</i> presentes en el banco de germoplasma.....	13
2. Descripción de los partidores utilizados en el protocolo de PCR Multiplex-Ready. El primer set de partidores consiste en los partidores específicos para cada marcador, más una secuencia inespecífica predeterminada para el partidor sentido y una para el partidor antisentido. El segundo set de partidores generales constan de una secuencia complementaria a las secuencias inespecíficas. El partidor general sentido se marcó con fluoróforos.....	19
3. Integridad de ADN de las extracciones realizadas en las 54 accesiones de <i>F. chilensis</i> , comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa (0,7%). λ : marcador de concentración de ADN (20 ng/ μ l).....	25
4. Geles de agarosa (2% p/v) de los productos de PCR de la optimización del protocolo de PCR multiplex-ready. A: ChFaM023, B: COBRA, C: BFACT029 y D: FvH4045. En los 4 marcadores las accesiones utilizadas fueron CHA: Chanco, MAN: Manzanar, TRA: Trancas y 3ST: 3 esteros.....	26
5. Electroforesis capilar de los productos de PCR para la optimización del protocolo PCR multiplex-ready. A: ChFaM023 (asignado VIC), B: EMFn181 (asignado FAM), C: EMFn121 (asignado PET).....	28
6. Electroforesis capilar de los productos de PCR del marcador CO816938 en 3 accesiones de <i>F. chilensis</i> . Las marcas bajo cada peak señalan los alelos detectados por el programa. Los denotados como “removed” fueron remociones manuales de peaks considerados posibles artefactos.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		PÁGINA
En el texto		
7.	Electroforesis en gel de agarosa y electroforesis capilar de los productos de PCR del marcador EMFvi136. A: Productos de PCR exitosamente amplificados en 16 accesiones de <i>F. chiloensis</i> . B: electroferograma de los productos de PCR en 6 accesiones. El recuadro denota el espacio donde debería haber alelos según el gel de agarosa.....	30
8.	Resultados del análisis del programa LOSITAN. Los marcadores en las zonas de color rojo y amarillo corresponden a los loci bajo selección. En la zona roja se marcan los loci bajo selección positiva y en amarillo los loci bajo selección balanceada.....	32
9.	Gráficos K = 1-10 obtenidos mediante el análisis de STRUCTURE HARVESTER. En estos se observa: A. La probabilidad de la existencia de K grupos (L(K)). B. promedio de la tasa de cambio de la distribución de la probabilidad de K (L'(K)). C. valor absoluto de la tasa de cambio segundo orden de la distribución de probabilidad de K (L''(K)). D. valor promedio de la tasa de cambio de segundo orden (L'''(K)), dividido por el error estándar de la distribución de L(K), valor determinado como ΔK , cuyo valor modal determina el valor real de K.....	33
10.	Gráfico de barras del análisis admixture de STRUCTURE donde K = 3, de las 54 accesiones de <i>F. chiloensis</i>	34
11.	Mapa de las 54 accesiones de <i>F. chiloensis</i> con sus respectivos porcentajes de pertenencia a los grupos genéticos establecidos por el análisis de STRUCTURE. Grupo genético 1 (Negro), grupo genético 2 (gris claro) y grupo genético 3 (gris oscuro).....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		PÁGINA
<u>En el texto</u>		
12.	Gráfico de puntos del desequilibrio de ligamiento (r^2) de todo el genoma en 54 accesiones de <i>F. chilensis</i> . La línea horizontal corresponde al percentil 95 de la distribución de r^2 no ligado, lo cual fue determinado como el valor crítico de r^2	36
<u>En el apéndice</u>		
1-A.	Gráfico de dispersión que muestra los dos principales ejes del análisis de coordenadas principales (PCoA) de todas las accesiones de <i>F. chilensis</i> basado en los datos de los microsatélites.....	62



I. RESUMEN

La frutilla chilena [*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.], parental materno de la frutilla comercial (*Fragaria ×ananassa* Duch.), se caracteriza por tener frutos de alta calidad organoléptica y con aptitud para crecer en áreas donde la sequía y la salinidad representan una limitante para el desarrollo frutícola. *F. chiloensis* se ha convertido en un material valioso para el mejoramiento genético de la frutilla comercial, especialmente para programas de mejoramiento con un *background* genético limitado. En el presente estudio se examinaron los patrones de desequilibrio de ligamiento, diversidad genética y estructura poblacional en 54 accesiones de *F. chiloensis* para entender la base genética de la especie. De un set de 95 marcadores microsatélite (SSR) de *F. ×ananassa*, previamente evaluados en *F. chiloensis* se seleccionaron 38 marcadores presentes en el mapa de ligamiento de *F. ×ananassa*. Los marcadores SSR produjeron un total de 259 alelos, con tamaños que variaban entre los 112 y 342 bp. Se encontró una diversidad genética a nivel de especie más baja comparado a otros estudios en la especie ($H_E = 0,17$, Shannon's index = 0,28). No se encontró un patrón según regiones climáticas de acuerdo a la diversidad evaluada con los marcadores SSR. El análisis de estructuración genética señala que las accesiones están agrupadas en tres grupos genéticos significativamente diferenciados. Las estimaciones de ϕ_{ST} de a pares indicaron una baja diferenciación entre los grupos genéticos, con valores entre 0,023 y 0,06. Estos grupos coinciden con refugios potenciales durante la glaciación en la zona, con varias accesiones que son una mezcla de dichos grupos.

II. ABSTRACT

Chilean strawberry [*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.] is the maternal progenitor of the commercial strawberry (*Fragaria ×ananassa* Duch.), which is characterized by fruits with high organoleptic quality and is well-suited to areas where drought and salinity represent a constraint on crop growth and productivity. *F. chiloensis* has become a valuable source for the genetic improvement of the commercial strawberry, in particular for breeding programs with limited genetic background. Therefore, the patterns of linkage disequilibrium were examined, genetic diversity and population structure in 54 accessions of *F. chiloensis* to understand the genetic basis of this species. Thirty-Eight markers were selected from a 95 microsatellite marker set that were previously cross-amplified from *F. ×ananassa* to *F. chiloensis*. The SSR primers produced a total of 259 alleles, which varied between 112 and 342 bp. A lower genetic diversity at the species level ($H_E = 0.17$, Shannon's index = 0.28) was found, compared to previous studies with this species. No climatic region pattern for SSR diversity were observed. Structure analysis suggests that the accessions are grouped in three significantly differentiated clusters. Pairwise estimates of ϕ_{ST} indicated low degree of differentiation between the three genetic groups, with values ranging from 0.023 to 0.06. These groups are in concordance with potential glacial refugia in the region, with many accessions being an admixture of them.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 El género *Fragaria*

3.1.1 Taxonomía del género *Fragaria*

Las especies del género *Fragaria*, comúnmente conocidas como frutillas o fresas, pertenecen a la familia Rosaceae, una familia que posee numerosas especies de importancia económica además del género *Fragaria*, entre ellas: *Malus domestica* Borkh. (manzana), *Pyrus* spp. (peras), *Prunus* spp. (durazno, damasco, cereza, almendra, ciruelo), *Rubus* spp. (mora, frambuesa) y *Rosa* spp. (rosas), las que se cultivan tanto por sus frutos para consumo humano, como con fines ornamentales (Longhi *et al.*, 2014). El género *Fragaria* está compuesto por 21 especies silvestres, incluyendo la recientemente descubierta *Fragaria cascadiensis* K.E.Hummer (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009; Durham, 2013), y 3 especies que corresponden a híbridos no naturales (Folta y Davis, 2006). Varias de las especies del género ya fueron descritas e incluso comenzó su cultivo entre los años 1500 al 1700 (Folta y Davis, 2006). Las primeras variedades cultivadas en Europa derivaron de *Fragaria vesca* L. y *Fragaria moschata* Duch., mientras que en Sudamérica existen antecedentes del cultivo de *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. (Hancock, 1999).

De las 24 especies, la mitad corresponden a especies diploides, con 7 cromosomas base ($2n = 2x = 14$), cinco corresponden a especies tetraploides ($2n = 4x = 28$), una hexaploide ($2n = 6x = 42$), cuatro octoploides ($2n = 8x = 56$), incluyendo la frutilla comercial (*Fragaria ×ananassa* Duch.) y la frutilla nativa chilena (*F. chiloensis*). Las dos especies restantes han mostrado más de un nivel de ploidia: *Fragaria x bringhurstii* Staudt, que se ha reportado como penta, hexa y nonaploide ($2n = 9x = 63$), y *Fragaria iturupensis* Staudt, de la cual se han registrado individuos tanto octoploides como decaploides ($2n = 10x = 70$) (Hummer *et al.*, 2009).

La cantidad de especies poliploides en este género se encuentra parcialmente explicada por la producción de gametos funcionales no reducidos (gametos que no pasaron por la meiosis II y por lo tanto poseen una ploidía el doble de lo normal para la especie) en varias de las *Fragaria* diploides y poliploides (Bringhurst y Gill, 1970), lo cual contribuyó a la duplicación del número

de cromosomas en los poliploides del género. Sin embargo, el origen de la poliploidía en el género no está completamente dilucidada. Al respecto, Davis *et al.* (2007) proponen que *F. vesca*, *Fragaria nubicola* (Lindl. ex Hook.f.) Lacaita y *Fragaria orientalis* Losink serían los posibles progenitores de las especies octoploides. Rosseau-Gueutin *et al.* (2009) señala que *F. vesca* o *Fragaria mandshurica* Staudt habrían aportado un tetraploide y que los otros 2 subgenomas habrían sido aportados por *Fragaria iinumae* Makino. En tanto, Tennessen *et al.* (2014) en base a sus hallazgos, propusieron que un genoma deriva de un ancestro similar a *F. vesca*, uno de un ancestro similar a *F. iinumae* y los dos subgenomas restantes provendrían de un autotetraploide formado de ese ancestro de *F. iinumae*.

3.1.2 La frutilla nativa chilena

Fragaria chiloensis, comúnmente conocida como frutilla de la costa, frutilla de playa o la frutilla chilena, es una especie que se conoce por ser el parental materno de la frutilla cultivada (*F. ×ananassa*). Se distribuye a lo largo de la costa pacífica de América y también en Hawaii (Staudt, 1989). Es una especie siempreverde de hojas trifoliadas, con flores blancas que se producen entre primavera y comienzo del verano. El fruto es comestible, usualmente rojo en la superficie, mientras que el interior es blanco (USDA, 2006).

Existen numerosas subespecies descritas de *F. chiloensis*: En la costa pacífica de Norteamérica se encuentran las subespecies *F. chiloensis* subsp. *lucida* (E. Vilm. Ex Gay) Staudt y *F. chiloensis* subsp. *pacifica* Staudt, en Hawaii se encuentra la subespecie *F. chiloensis* subsp. *sandwicensis* (Decne.) Staudt, y en Sudamérica se encuentra la subespecie *F. chiloensis* subsp. *chiloensis*, la cual posee 2 formas botánicas: la forma *chiloensis*, que se caracteriza por poseer un fruto de color blanco y la forma *patagonica*, que se caracteriza por poseer fruto de color rojo (Staudt, 1999). Esta última subespecie, es la conocida como la frutilla nativa chilena, a pesar de que la forma patagónica también es posible encontrarla en la Patagonia Argentina.

La frutilla chilena fue domesticada por los Mapuches y Picunches, pueblos originarios, desde hace más de mil años (Hancock *et al.*, 1999; Finn *et al.*, 2013). Es una especie que aún se sigue cultivando, con escasa aplicación de técnicas agronómicas modernas (Retamales *et al.*, 2005). *F. chiloensis* es el parental materno de la frutilla comercial, *Fragaria ×ananassa*, la cual es

cultivada a nivel mundial y es uno de los berries más importantes del mercado (Hancock *et al.*, 1999).

Su distribución geográfica es amplia, abarcando múltiples condiciones climáticas y de suelo, a las que se encuentra adaptada, y varía según la forma botánica (Staudt, 1962). La forma *chiloensis*, se encuentra desde Iloca (34°55'S) en la Región del Maule, hasta Mar Brava, Chiloé (41° 50'S) en la Región de los Lagos, desde la orilla del mar hasta los 1850 metros de altura; y la forma *patagonica* se distribuye desde Vilches (35° 30' S) en la Región del Maule hasta 25 km al sur de Cochrane (Laguna Larga, 47° 33' S) en la Región Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo (Lavín *et al.* 2000). Se estima que los ancestros de la especie se originaron en Asia oriental y se habría diseminado a América del Norte por el estrecho de Bering, y posteriormente llega hacia América del sur mediante aves migratorias (Hancock *et al.*, 1999).

F. chiloensis puede reproducirse tanto de manera sexual como asexual. Es posible encontrar individuos dioicos, hermafrodita y poligamodioicos (Staudt, 1967; Hancock y Bringhurst 1979), sin embargo la mayoría corresponde a individuos dioicos pistilados (Hancock y Bringhurst, 1980). En tanto, la principal forma de reproducción asexual corresponde a estolones, aunque también existen casos donde la yema axilar, que pueden dar origen a una nueva corona. Estos agregados conectados por estolones pueden estar compuestos desde unos pocos individuos hasta cientos, y se encuentran compuestos predominantemente por un genotipo aunque existe la posibilidad que otros se encuentren presentes (Hancock y Bringhurst, 1980).

Su fruto, pertenece al grupo clasificado como berries, los que incluyen a frutos comestibles de pequeño tamaño de diversas familias, de alto valor económico, ya que presentan múltiples alternativas en sus usos, así como mercados de destino (FIA, 2002). Éste posee numerosas características de interés agronómico, como su intenso aroma y sabor (Retamales *et al.*, 2005). Además, la especie tiene un amplio espectro de resistencia a plagas y enfermedades, entre estas últimas a *Phytophthora fragariae* Hickman, *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold y *Botrytis cinerea* Pers. Ex.:Fr. (Retamales *et al.*, 2005; González *et al.*, 2009) y adaptabilidad a fotoperiodos y tolerancia a frío, salinidad y sequía (Lavín *et al.*, 2000; Lavín y Maureira, 2002).

En la literatura se ha reportado que un mayor número de adaptaciones específicas a diversas zonas agroecológicas en *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* que en las subespecies de *F. chiloensis* presentes en Norteamérica (Hancock *et al.*, 1999). Sin embargo, la especie posee algunos problemas que han impedido que su cultivo se realice a gran escala, incluyendo una baja productividad, una corta época de producción (de aproximadamente dos meses) y el rápido ablandamiento de su fruto (Retamales *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2008).

Al ser el parental materno de la frutilla comercial, *F. chiloensis* posee particular utilidad, ya que en distintos programas de mejoramiento genético se consideran las especies silvestres para introducir mayor variabilidad (Zamir, 2001). Otros estudios han realizado introgresiones con *Fragaria virginiana* Mill. subsp. *glauca* a *F. ×ananassa* en 6 cultivares, para introducir la característica de planta de día neutro (Ahmadi *et al.*, 1990). Por otra parte, individuos seleccionados de *F. chiloensis* (parental materno) y *F. virginiana* (parental paterno de *F. ×ananassa*), se han hibridado para generar poblaciones que expandan la base genética de los programas de mejoramiento de *F. ×ananassa* y complementar su baja diversidad genética (Stegmeir *et al.*, 2010; Hancock *et al.*, 2010). Estas cruzas realizadas con los mismos parentales de la frutilla comercial han sido posibles debido a que los cruzamientos originales realizados por Duchesne y otros a principios del 1700 se encuentran bien documentados (Darrow, 1966). De esta forma se espera superar las limitantes que existen en los programas de mejoramiento de *F. ×ananassa* (Hancock *et al.*, 1993).

3.1.3 *F. Chiloensis* como modelo de estudio de maduración de frutos

Se han realizado múltiples estudios relacionados al proceso de maduración de la especie, tales como a la tasa de ablandamiento y niveles de expresión de enzimas relacionadas a la degradación de la matriz de la pared celular (Figueroa *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2010), desarrollo de compuestos volátiles responsables del aroma (González *et al.*, 2009), síntesis de flavonoides (Saud *et al.*, 2009; Salvatierra *et al.*, 2011) y tratamientos postcosecha con hormonas (Figueroa *et al.* 2012, Concha *et al.* 2013). *F. chiloensis* ha sido propuesta como un complemento para el modelo para los estudios de maduración en frutos no climatéricos (Cherian *et al.*, 2014), ya que a pesar de que *F. ×ananassa* es el modelo mayormente estudiado a nivel

mundial, el fruto de *F. chiloensis* tiene características especiales relacionadas a su maduración como el ablandamiento, color y aroma (Nishizawa *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2010).

3.2 Diversidad genética, Estructura poblacional y desequilibrio de ligamiento en especies del género *Fragaria*

3.2.1 Marcadores moleculares y sus estudios en el género *Fragaria*

Se han utilizado varios marcadores moleculares en el género *Fragaria*. Entre ellos, los marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) han sido utilizados para la construcción del primer mapa de ligamiento en el género (Davis y Yu, 1997) y la identificación de cultivares de frutilla (Congiu *et al.*, 2000). En tanto, los marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) se utilizaron para intentar identificar 19 cultivares de *F. ×ananassa*, sin éxito en poder establecer resultados replicables con otro tipo de marcadores (Degani *et al.*, 2001), para la identificación de resistencia a la antracnosis (Lerceteau-Köhler *et al.*, 2003) y el estudio de diversidad genética en *F. chiloensis* (Becerra *et al.*, 2001). Los marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) se desarrollaron para el mapeo de individuos de *F. vesca*, y ligar dichos marcadores al locus de temporada de floración (Cekic *et al.*, 2001).

Los marcadores microsatélite o SSR (*Simple Sequence Repeat*), son repeticiones de 1 a 6 pares de bases, que se repiten hasta 60 veces, los que son amplificados mediante PCR con primarios ubicados en las zonas flanqueantes a dichas repeticiones (Goldstein y Pollock, 1997), y pueden encontrarse tanto en regiones codificantes como no codificantes del ADN. Estos marcadores han tenido múltiples aplicaciones en especies del género *Fragaria*, como *F. ×ananassa*, *F. virginiana*, *F. vesca* y *F. nubicola*. Entre esas aplicaciones, se encuentran la construcción de mapas genéticos de referencia (Sargent *et al.*, 2006; Sargent *et al.*, 2009b; Sargent *et al.*, 2012), la identificación de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de características productivas o de calidad de fruto (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2011a), la identificación de cultivares (Brunings *et al.*, 2010) y asociación de loci a la identificación de sexo (Spigler *et al.*, 2008). Estos han sido preferidos por largo tiempo, debido a su alto polimorfismo y reproducibilidad, además de la facilidad para transferirlos entre especies del género, ya que poseen una transferibilidad de entre el 70 y el

100% (Sargent, 2009a; Foltá y Davis, 2006), sin embargo, son escasos los estudios que se han enfocado en la diversidad genética de poblaciones en especies del género, en particular, en *F. chilensis* la única referencia sobre el tema es Carrasco *et al.* (2007).

Los últimos estudios desarrollados en *F. ×ananassa* han apuntado al desarrollo de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), lo cual se ha facilitado debido a la secuenciación del genoma completo de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011). Esto permitió el desarrollo de un chip 90 K Affymetrix® Axiom® array, en el cual secuencias cortas de *F. ×ananassa* se alinearon al genoma de referencia para la identificación de SNP e *indels* (inserciones y deleciones) (Bassil *et al.*, 2015).

En general el uso de los marcadores RAPD ha decaído debido a la dificultad de obtener resultados reproducibles (Jones *et al.*, 1997). En tanto, los marcadores AFLP siguen siendo una alternativa viable para obtener resultados replicables en el género *Fragaria* (Shimomura *et al.*, 2005), pero que no poseen todas las ventajas de los marcadores SSR, como su transferibilidad entre especies, su abundancia a lo largo del genoma y la cantidad de alelos por locus (Yamamoto *et al.*, 2001; Lerceteau-Kohler *et al.*, 2003). Finalmente, los marcadores SNP se perfilan como la opción más informativa y replicable, pero genotipificar poliploides presenta numerosos desafíos, especialmente en los aloploiploides, debido a que es posible confundir un marcador SNP con una variante paróloga (Kaur *et al.*, 2012)

3.2.2 Diversidad genética en poliploides del género *Fragaria*

La poliploidía es el resultado de uno o más eventos de duplicación del genoma completo (*whole-genome duplication*, WGD) (McGrath y Lynch, 2012). Este es un fenómeno observado comúnmente en plantas, el cual es asociado a un mayor éxito de los individuos en entornos naturales. Los eventos de poliploidía pueden clasificarse en autoploidía, si es que hay un aumento en la ploidía dentro de una misma especie (incluso dentro de un individuo), o aloploidía, que está dada por al hibridización de dos o más especies distintas, donde cada cual contribuye una dotación cromosómica completa (McGrath y Lynch, 2012).

Numerosos estudios señalan que los poliploides del género *Fragaria* poseen una gran cantidad de marcadores que segregan de manera disómica, lo cual sugiere una composición de alopoliploide (Hirakawa *et al.*, 2014), es decir, que cada par de cromosomas aportados por los diploides que contribuyeron a la formación del poliploide, recombinará entre su propio subconjunto de los cromosomas, y por tanto tendrá un comportamiento similar a la segregación de los diploides (Coyne y Orr, 2004). El comportamiento de segregación disómica de la herencia marcadores SSR en el género *Fragaria* facilita su utilización para estudios de genética (Ashley *et al.*, 2003). Se han reportado casos de marcadores SSR con un comportamiento polisómico (Ashley *et al.*, 2003; Cipriani y Testolin, 2004; Gil-Ariza *et al.*, 2006; Govan *et al.*, 2008; Spigler *et al.*, 2008; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2011b), sin embargo, en estos estudios se señala que son excepcionales, siendo la gran mayoría de comportamiento disómico (Spigler *et al.*, 2008).

Los estudios de diversidad genética en poliploides han avanzado menos en comparación a los estudios de diploides debido a las dificultades que presenta su compleja heredabilidad (Luo *et al.*, 2001; Pfeiffer *et al.*, 2011). En ploidías sobre $5n$, los patrones de bandas de marcadores codominantes son analizados como si se tratasen de marcadores dominantes, con la presencia y ausencia de todos los alelos presentes en un individuo (Pérez-Collazos y Catalán, 2006), ya que técnicas como el conteo de alelos a través de las proporciones de peaks (MAC-PR) son imposibles de realizar (Helsen *et al.* 2009).

Además, se han desarrollado métodos estadísticos para poder analizar los atributos genéticos de los alopoliploides y autopoliploides en distintos paquetes de software (Ronfort *et al.*, 1998; Catalán *et al.*, 2005; Markwith *et al.*, 2006; Falush *et al.*, 2007; Clark y Jasieniuk, 2011), basándose en la frecuencias alélicas, pero con el falso supuesto de que en los genotipos parcialmente heterocigotos, cada alelo tiene una probabilidad igual de estar presente en más de una copia, pero que compensa la pérdida de información con la versatilidad de poder trabajar los datos independiente del nivel de ploidía (Clark y Jasieniuk, 2011).

En *F. chiloensis* subsp. *chiloensis*, los estudios de diversidad y estructura genética son escasos. Por una parte Becerra *et al.* (2001), mediante marcadores AFLP e isoenzimas determinó que existía una baja diversidad entre las 61 accesiones evaluadas, señalando que de 172 bandas de

AFLP evaluadas, solo 37 eran polimórficas. También, Becerra *et al.*, (2005), con la misma metodología y muestras reportan que existe una alta diversidad morfológica, pero que un 90% de los genotipos se agrupan en un mismo clúster, pero destaca que Becerra *et al.*, (2002), mediante RAPD logra generar fenogramas con grupos diferenciados, sobre los mismos individuos.

En tanto, Carrasco *et al.* (2007) determinó mediante la evaluación de 6 partidores ISSR que existía una diversidad genética alta en *F. chiloensis* subsp. *chiloensis*, aunque esto podía estar explicado por el tamaño de la muestra, la cantidad de bandas analizadas y la alta variabilidad inherente a los marcadores ISSR. Respecto de la estructura de poblaciones, Carrasco *et al.* (2007) señala que la variabilidad se encontraba agrupada según formas botánicas, y que respecto del origen geográfico, existe una baja estructuración de la diversidad de marcadores ISSR, aunque existe una menor variabilidad genética en las latitudes extremas de su distribución. Sin embargo, estos trabajos realizados en *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* se realizaron sobre la base de un banco de germoplasma colectado según lo reportado por Lavín *et al.* (2000), el cual ya no se encuentra disponible (INIA, comunicación personal).

En los estudios realizados en *F. chiloensis* subsp. *chiloensis*, se ha obtenido una comprensión parcial de la diversidad genética de la especie y como se encuentra distribuida. Sin embargo, no se han determinado las zonas que contienen mayor diversidad genética. Estas permiten comprender los procesos ecológicos y evolutivos de la especie, y además, determinar individuos distintos entre sí para programas de mejoramiento o introgresar genes deseables que estos individuos posean (Mohammadi y Prasanna, 2003). Además, el conocer su diversidad genética permite establecer que tan representativos son los bancos de germoplasmas disponibles de la especie y los recursos genéticos disponibles de la especie (Brown y Munday, 1982).

3.2.3 Desequilibrio de ligamiento en especies del género *Fragaria*

El desequilibrio de ligamiento (LD), está definido como la asociación no aleatoria de pares de alelos en distintos loci, los cuales se desvían de las frecuencias esperadas para los haplotipos (Hill y Robertson, 1968). El desequilibrio de ligamiento puede estar causado por una distancia física o bien por otras fuerzas pueden causarlo en poblaciones naturales, como la deriva génica,

los patrones de cruza y el flujo génico entre poblaciones (Flint-Garcia *et al.*, 2003). Estas relaciones entre loci permiten establecer asociaciones entre marcadores y características fenotípicas, lo cual es denominado mapeo asociativo (Sorkeh *et al.*, 2008). En numerosos estudios se ha señalado que es necesario hacer uso de la información que provee el LD para poder trazar alelos valiosos para el mejoramiento genético dentro del germoplasma de una especie (Malysheva-Otto *et al.*, 2006; Raboin *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2011).

En el género *Fragaria* existen escasos reportes sobre el desequilibrio de ligamiento, de manera similar a como ha ocurrido con otras especies de la familia Rosaceae (Khan y Korban, 2012). En *F. vesca* se ha determinado que existen numerosos marcadores con un desequilibrio de ligamiento bajo, debido a la alta cantidad de autocruzas (Hadonou *et al.*, 2004; Cipriani y Testolin, 2004; Montfort *et al.*, 2006). Esto coincide con lo reportado por Li *et al.* (2011), donde solo 4 pares de loci tenían un desequilibrio de ligamiento significativo en 11 marcadores SSR evaluados (CX661264, CX661603, CX662180, CO816938, EMFv160AD, UDF002, EMFn153, ARSFL7, ARSFL27, Fvi11 y BFACT10). Por el contrario, Yoon *et al.*, (2012) determinaron un bajo equilibrio de ligamiento entre 18 marcadores SSR en *F. ×ananassa* (EMFax380097, EMFax381869, EMFax381827, CFACT110, EMFn226, CFACT104, EMFaxCAD2, UFFa02H04, EMFax381877, EMFn125, EMFnCEL2, CFACT084, CFACT152, EMFxaPDC2, ENFxaQR, CFACT 100, EMFxaEKO1Ba y EMPaEKO1B), de los cuales 14 no estaban en equilibrio de Hardy-Weingberg.

En particular, en los estudios de *F. chiloensis* realizados por Becerra *et al.* (2001), Becerra *et al.* (2002), Becerra *et al.* (2005) y Carrasco *et al.* (2007), no se determinó desequilibrio de ligamiento, y de forma similar a algunos trabajos en *F. ×ananassa*, se menciona la poliploidía como causa para no determinarlo (Bassil *et al.*, 2006). Sin embargo, actualmente existen trabajos donde se ha podido determinar el desequilibrio de ligamiento en especies aloploidoides, y debido a que hay disponible un mapa de ligamiento para *F. ×ananassa* (Sargent *et al.*, 2012), es posible utilizarlo como referencia para estimar el decaimiento del desequilibrio de ligamiento.

Debido a que los estudios existentes en *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* no proveen un consenso sobre la diversidad genética y a que no existe información disponible sobre el desequilibrio de

ligamiento en la especie, el presente estudio plantea analizar la diversidad genética, la estructura poblacional y el desequilibrio de ligamiento en una colección de accesiones chilenas de la especie, utilizando marcadores SSR. Con esto, se espera validar los resultados obtenidos con otros marcadores moleculares, en una colección actualizada de accesiones de *F. chiloensis*. Esto permitirá establecer grupos genéticos representativos, que permitirán capturar la mayor cantidad de diversidad genética posible, tanto para su conservación como para su utilización en programas de mejoramiento genético. Por otra parte, el desequilibrio de ligamiento permitirá discernir que tantos marcadores son necesarios para realizar mapeo genético en la especie, lo cual permitirá sentar las bases para un programa de mejoramiento para la especie, o bien, integrarla en un programa de mejoramiento de *F. ×ananassa*.



IV. METODOLOGÍA

4.1 Material vegetal

Para el estudio se utilizaron 54 accesiones de *F. chilensis* subsp. *chilensis*, distribuidas entre la Región del Maule y la Región Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo (Figura 1, Tabla 1). Las plantas fueron recolectadas en locaciones descritas por Lavín *et al.* (2000) y 51 de estas se encuentran caracterizadas por Mora *et al.* (2016), mientras que las 3 restantes corresponden a colectas recientes. Las plantas se transportaron al vivero de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, donde se viverizaron y mantuvieron en un sustrato compuesto de turba y humus en proporción 7:3, con riego controlado.

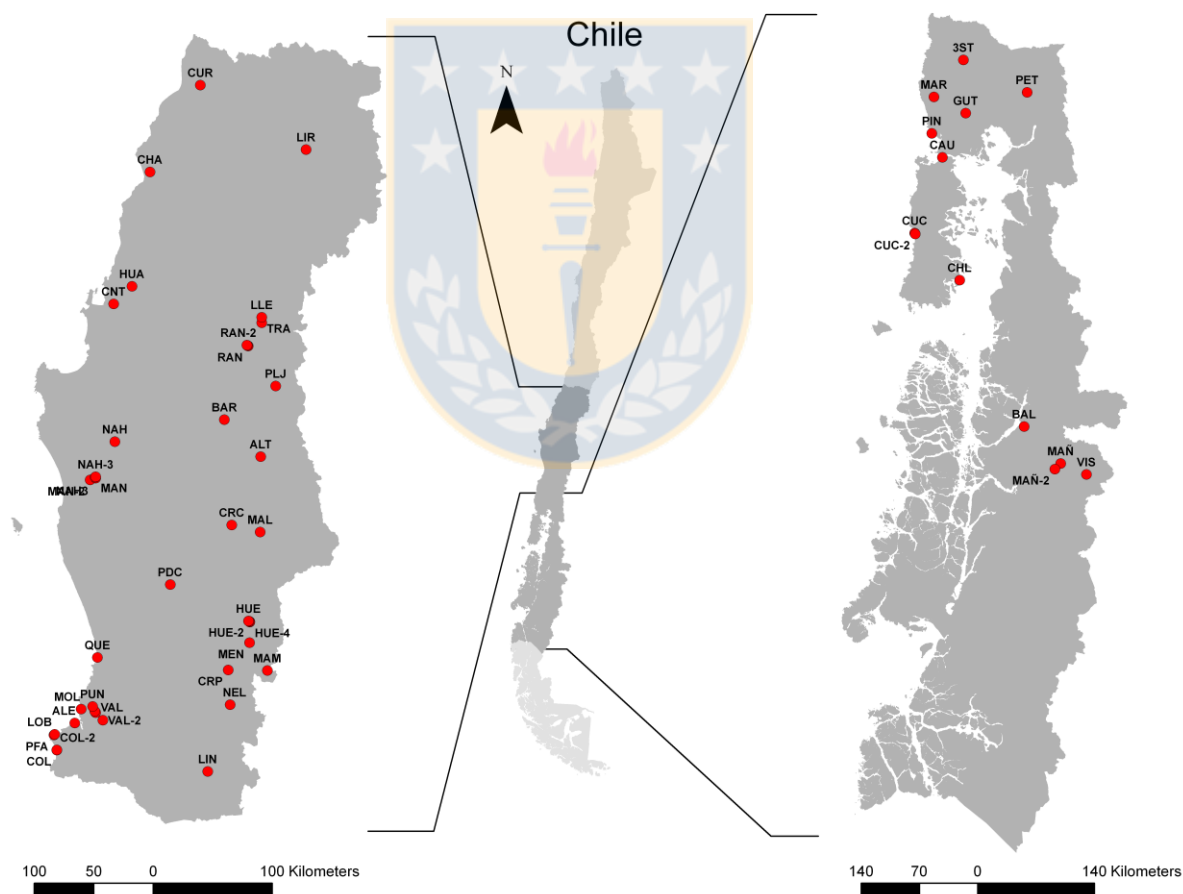


FIGURA 1. Mapa de las accesiones de *F. chilensis* presentes en el banco de germoplasma. Fuente: Elaboración propia.

TABLA 1. Lista de las accesiones de *F. chilensis* utilizadas, código, región climática, población putativa y ubicación geográfica. Las abreviaciones MTM, FCM, HPM, CM y PAT corresponden a sus respectivas regiones climáticas, según lo descrito por Lavín *et al.* (2000). Fuente: Elaboración propia.

Código	Nombre de la Accesión	Región climática	Población putativa	Natural / Domesticada	Coordenadas
MAN	Manzanar	Mediterráneo marino y templado	MTM	Domesticada	38°02'30.24" S 73°08'38.44" O
MAN-2	Manzanar 2	Mediterráneo marino y templado	MTM	Domesticada	38°03'13.40" S 73°11'46.62" O
NAH	Nahuelbuta	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	37°46'21.02" S 72°56'43.14" O
NAH-2	Nahuelbuta 2	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	38°02'04.82" S 73°08'52.09" O
NAH-3	Nahuelbuta 3	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	38°01'53.26" S 73°08'37.27" O
QUE	Queule	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	39°23'53.82" S 73°12'21.42" O
CHA	Chanco	Mediterráneo marino y templado	MTM	Domesticada	35°44'23.04" S 72°30'58.01" O
CUR	Curepto	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	35°05'43.84" S 72°01'31.23" O
LIR	Lircay	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	35°36'17.20" S 71°03'51.80" O
CNT	Contulmo	Mediterráneo marino y templado	MTM	Domesticada	36°43'43.40" S 72°54'07.60" O
HUA	Huaro	Mediterráneo marino y templado	MTM	Domesticada	36°36'03.70" S 72°43'28.33" O
BAR	Santa Bárbara	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	37°38'05.65" S 71°53'46.17" O
PDC	Padre de las Casas	Mediterráneo marino y templado	MTM	Natural	38°52'11.32" S 72°28'05.83" O
MOL	Molinos	Marino fresco y frío	FCM	Natural	39°47'00.85" S 73°23'20.90" O
PUN	Punucapa	Marino fresco y frío	FCM	Natural	39°46'04.18" S 73°16'27.84" O
ALE	Alerce	Marino fresco y frío	FCM	Domesticada	39°53'07.63" S 73°27'24.03" O
SAV	Saval	Marino fresco y frío	FCM	Natural	39°48'13.48" S 73°15'22.14" O

(Continuación Tabla 1)

VAL	Valdivia	Marino fresco y frío	FCM	Domesticada	39°48'53.90" S 73°14'56.70" O
VAL-2	Valdivia 2	Marino fresco y frío	FCM	Natural	39°52'28.00" S 73°10'52.15" O
COL	Colún	Marino fresco y frío	FCM	Natural	40°05'01.10" S 73°38'48.80" O
COL-2	Colún 2	Marino fresco y frío	FCM	Natural	40°04'57.50" S 73°38'50.10" O
LOB	Lobos	Marino fresco y frío	FCM	Natural	39°57'50.00" S 73°39'36.00" O
PFA	Pta. Falsa	Marino fresco y frío	FCM	Natural	39°58'08.70" S 73°40'04.30" O
CUC	Cucao	Marino fresco y frío	FCM	Natural	42°35'50.30" S 74°07'26.80" O
CUC-2	Cucao 2	Marino fresco y frío	FCM	Natural	42°36'27.60" S 74°07'03.20" O
CHL	Chaiguao	Marino fresco y frío	FCM	Natural	43°07'58.90" S 73°30'25.10" O
LIN	Linalhue	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	40°17'46.80" S 72°10'12.58" O
3ST	3 Esteros	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	40°45'30.10" S 73°17'19.90" O
GUT	Cuesta Gutierrez	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	41°19'58.10" S 73°17'40.60" O
CAU	Caulín	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	41°47'53.80" S 73°39'36.40" O
MAÑ	Mañihuales	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	45°09'49.00" S 72°07'21.00" O
MAÑ-2	Mañihuales 2	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	45°13'20.00" S 72°12'52.00" O
MAR	Mar Brava	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	41°08'27.80" S 73°44'04.60" O
PIN	Pinuno	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	41°31'56.20" S 73°47'39.50" O
PET	Petrohué	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	41°08'17.50" S 72°24'08.30" O
VIS	Vista Hermosa	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	45°17'36.00" S 71°44'01.36" O
BAL	Balmaceda	Marino húmedo patagónico	HPM	Natural	44°44'54.41" S 72°39'17.11" O

(Continuación Tabla 1)

LLE	Lleuque	Mediterráneo frío	CM	Natural	36°52'04.60" S 71°30'53.20" O
TRA	Trancas	Mediterráneo frío	CM	Natural	36°54'34.00" S 71°30'56.40" O
RAN	Ranchillo	Mediterráneo frío	CM	Natural	37°04'57.41" S 71°39'01.86" O
RAN-2	Ranchillo-2	Mediterráneo frío	CM	Natural	37°04'32.70" S 71°39'41.00" O
RAN-3	Ranchillo-3	Mediterráneo frío	CM	Natural	37°04'49.10" S 71°39'21.90" O
PLJ	Laguna del Laja	Mediterráneo frío	CM	Natural	37°23'29.13" S 71°23'57.72" O
MAL	Malalcahuello	Polar alpino tundra	PAT	Natural	38°29'39.96" S 71°35'10.52" O
MAM	Mamuil-Malal	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°32'42.90" S 71°33'13.50" O
HUE	Huerquehue	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°10'01.30" S 71°43'22.70" O
HUE-2	Huerquehue 2	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°10'02.70" S 71°43'05.00" O
HUE-3	Huerquehue 3	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°10'19.50" S 71°42'43.50" O
HUE-4	Huerquehue 4	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°10'30.00" S 71°42'42.80" O
CRP	Coñaripe	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°31'56.89" S 71°56'08.10" O
CRC	Curacautín	Polar alpino tundra	PAT	Natural	38°26'05.63" S 71°51'26.53" O
ALT	Alto Bio-Bio	Polar alpino tundra	PAT	Natural	37°55'24.56" S 71°33'34.73" O
NEL	Neltume	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°47'43.12" S 71°55'38.83" O
MEN	Menetue	Polar alpino tundra	PAT	Natural	39°19'51.30" S 71°43'12.60" O

Las accesiones Chanco, Huaro, Contulmo, Manzanar, Manzanar-2, Valdivia y Alerce corresponden a accesiones domesticadas, mientras que el resto corresponde a accesiones naturales. Las accesiones listadas como naturales se colectaron en lugares silvestres, lejos de

asentamientos humanos. Las accesiones domesticadas corresponden a la forma *chiloensis*, mientras que las naturales a la forma *patagonica*, según lo descrito por Mora *et al.* (2016).

4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo según el protocolo del DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), con modificaciones, en el Laboratorio de Epigenética Vegetal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción. Las modificaciones consistieron en aumentar el volumen de buffer AP1 a 600 μ l con 4% PVP (polivinilpirrolidona), el buffer AP2 a 200 μ l, se disminuyó la RNAsa a 3 μ l y se redujo la cantidad de material vegetal a 60 mg de hojas jóvenes. La molienda se realizó utilizando un homogenizador Presellys 24 (Bertis Technologies). Se verificó la integridad de ADN realizando electroforesis en gel de agarosa no denaturante al 0,7% (p/v), por 30 min a 70 v, utilizando un marcador de peso molecular lambda no digerido de concentración 20 ng/ μ l, y se estimó la cantidad de ADN mediante la comparación de la muestra con el lambda. Luego, se realizó una dilución para obtener una concentración final de ~5 ng/ μ l y se almacenó a -20°C para su uso en el análisis mediante PCR.

4.3 Marcadores SSR

Para el estudio de diversidad genética se utilizaron 39 marcadores SSR (Tabla 2), seleccionados a partir de los 78 marcadores transferidos previamente desde *F. ×ananassa* a *F. chiloensis* (Oñate, 2014). Los marcadores se seleccionaron porque estaban distribuidos de manera uniforme en el mapa de ligamiento de *F. ×ananassa* (Sargent *et al.*, 2012), o marcadores asociados a QTL de *F. ×ananassa*, o localizados en regiones que controlan características de importancia agronómica (Zorrilla-Fontanesi *et al.* 2011a) y su grado de polimorfismo en base a la evaluación realizada en geles de agarosa (Oñate, 2014). Las secuencias de oligonucleótidos se sintetizaron por “Oligo ADN Synthesis Service” (MacrogenTM).

TABLA 2. Lista de los 39 marcadores SSR utilizados en el estudio, incluyendo sus respectivos partidores, las referencias bibliográficas desde las cuales se obtuvieron y el grupo de ligamiento en el que aparecen en el mapa de ligamiento de Sargent *et al.* (2012) o en el mapa de QTL de Zorrilla-Fontanesi *et al.* (2011a). Fuente: Elaboración propia.

N°	Marcador	Partidor Sentido (F)	Partidor Antisentido (R)	Referencia bibliográfica	Grupo de ligamiento
1	ChFaM023	AGGAGAAGACCGGCTGTGTA	TGCCTATAGCTGTGGCTGTG	Gil-Ariza <i>et al.</i> 2006	F.2 ^b
2	EMFn121	GGTCCCTAAGTCCATCATGC	GAGTGGATGCAAACATGAGC	Sargent <i>et al.</i> 2006	FG2A/ FG2DB ^a
3	EMFn181	CCAAATTCAAATTCCTCTTTCC	GCCGAAAACTCAAACCTACC	Sargent <i>et al.</i> 2006	FG3C/ FG4A/ FG5D ^a
4	EMFvi136	GAGCCTGCTACGCTTTTCTATG	CCTCTGATTCGATGATTTGCT	Govan <i>et al.</i> 2008	F.2 ^b
5	ChFaM160	CCACTCCCCAAAAGAGCACA	CTGCCTCCACAATCCTCACC	Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i> 2011b	F.1 ^b
6	ChFaM044	CGCTGAGTCGTCTAATTTC	TTTTGTTGACGAGCGAGATG	Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i> 2011b	M.2 ^b
7	CFVCT027	TGGACATTGAAATCCTGCAC	GGTGAATCTCTTTTATGGGAGGA	Monfort <i>et al.</i> 2006	M.6 ^b
8	FvH4015	TGTTAGCTTGTGTGGAGTTTCG	TGATCACTCCACTCTCATCTGC	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG1B/ FG1C ^a
9	CFACT084	AAAAGTAGGCGGTGTGCAG	GAACAGATCCACCGAGCAGT	Sargent <i>et al.</i> 2008	FG2A/ FG2B/ FG2C ^a
10	FvH4026	TCAAGTCACAGTTTGCCTAGC	CTGACCTAGCTAATATCCAAGTGC	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG2A ^a
11	CO816938	CGAGGCCTTGTCTTCTTTGT	GCGGAGGTAGCTGTTGTAGC	Spigler <i>et al.</i> 2008	FG4A/ FG4B/ FG4D ^a
12	ARSFL004	GCGGTGCGATTGAGTTGGAGGATA	GCGTAGCCAAACACCGATCTACC	Lewers <i>et al.</i> 2005	FG4B ^a
13	BFACT045	ATGTAGGCACCCCTCAAA	GAGGCAGAAGTGTTTTTCGTG	Rousseau-Gueutin <i>et al.</i> 2008	FG3A/ FG3C ^a
14	ARSFL022	GCGAACCCCATTAACAGCTTCA	GCGATCAAATCCCTCTAACAAT	Lewers <i>et al.</i> 2005	FG6A/ FG6B/ FG6C/ FG6D ^a
15	CO818002	CTAGTAGCTCCACGCCAAGC	AATGTGTGGGAGAGGTGAGC	Spigler <i>et al.</i> 2008	FG1A/ FG1B/ FG1C/ FG1D ^a
16	FvH4079	GAACCACACAGAAAAGGAAACC	TGCAACAGTTTGTCTGACTACG	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG4A ^a
17	FvH4019	CATCTCAGTTGGATCAGAATCG	CAAGGAATCAAGGATCATAGGC	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG1B/ FG1C ^a
18	BFACT029	AGGGTGGGTTGTGTAATCCT	TGAAATGCCAGAGAGACAACCTT	Rousseau-Gueutin <i>et al.</i> 2008	FG7A/ FG7B ^a
19	CFACT087	GCAATTTTCAGCAATCCCTGT	TCAACTTATTCAGCACGAGCA	Sargent <i>et al.</i> 2008	FG4A/ FG4B/ FG4C ^a
20	FvH4156	GGGGGTATTTTGAAGTGTAAGC	GCGAAAAATATGAGAGGAGAGAGG	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG4A/ FG4B/ FG4C/ FG4D ^a
21	FvH4178	CAGAGGGTTTGATTTGACAGC	CGTAGTACAGTACGTCATGAGTGG	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG6B/ FG7A ^a
22	EMFn153	CTCGAGCTCCCTTTCTATCG	TGGCCAAATGTTCTCACTAGC	Sargent <i>et al.</i> 2006	FG6A/ FG6C ^a
23	BFACT018	AGGATCGGAGAACAGCAGAG	CTCCCTCCTCCTCAACTGTG	Rousseau-Gueutin <i>et al.</i> 2008	FG7A/ FG7B ^a
24	EMFn214	CTAATTCAGCCGCCAGGTC	CTGCAGCTCGTAACGACAAG	Sargent <i>et al.</i> 2006	FG2A/ FG2B/ FG2DA ^a
25	COBRA	TGGCACTGTAACATCACTTGG	TATTTGTTGCAGTTGAATATCG	Sargent <i>et al.</i> 2012	FG1A/ FG1B/ FG1C ^a
26	FvH4045	TGCAATGGAGACACAACAGAAG	TTGGAACAGAACACCCTAAGAC	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG3A ^a
27	FvH4025	GTTCAAGTTGAGAGCCATAATGC	GAATGATGAAAGGCAGCTAAGG	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG2A/ FG2B ^a
28	FvH4115	CCTACATATTTGAGGGAGTGG	CAGGCAAGTTGTTATTCCTTCC	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG5D ^a
29	FvH4123	GTTGAAGCAACCTTGAATGC	GGAGGACAACCTCAATTTATGG	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG6A/ FG6D ^a
30	FvH4089	ACTTTTGTCTCATGGTTGG	CAATATCAGACCCCTTTTCC	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG4A/ FG4B/ FG4C ^a
31	ChFaM022	GGGCCACTCCTACTTCTTCA	TTGGCCTTGAGAGCTTCGAT	Gil-Ariza <i>et al.</i> 2006	M.1 ^b

(Continuacion tabla 2)

32	ARSFL010	GCGTCAGCCGTAGTGATGTAGCAG	GCGCCAGCCCCTCAAATATC	Lewers <i>et al.</i> 2005	FG1A/ FG1B/ FG1C ^a
33	CO813853	CCATTCAAAACCTCCTCTCC	ATGGGTCCTTCGTCTGAGTG	Spigler <i>et al.</i> 2008	FG1B/ FG1C/ FG1D ^a
34	BFACT036	TGCAAGCTGACAAACAGAAAA	TCGGATCGATGTTACTTTCAGA	Rousseau-Gueutin <i>et al.</i> 2008	F.1/ FG3A/ FG3B/ FG3C ^{ab}
35	BFACT002	ACTAGGAAGATGCGGTGTGG	GCAGGGCTTCAGAGAAATCA	Rousseau-Gueutin <i>et al.</i> 2008	FG2A/ FG2C/ FG2DB ^a
36	FvH4160	TGTGTTATTGGTCCACATAGGC	GCAGGAAGTTTTTCGGCTAGG	Sargent <i>et al.</i> 2011	FG5B/ FG5C/ FG6A ^a
37	ChFaM196	CCTCTCACCTCTTCTCTCTAAAA	AGCGCATGAGTCTGCTGTTA	Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i> 2011b	FG5A/ FG5B/ FG5C/ FG5D ^a
38	CFVCT032	ACGCTTCATGCCATTCTCTT	CATCGATTCACTGCTGTCTGT	Monfort <i>et al.</i> 2006	FG3A/ FG6A/ FG7C ^a
39	CX661803	TCGAAAACCCAGCTCAATTC	AGCATGTTGCTGTACATGGC	Spigler <i>et al.</i> 2008	FG7A/ FG7C/ FG7D ^a

^a mapa de ligamiento de Sargent *et al.* 2012^b mapa de QTL de Zorrilla-Fontanesi *et al.* 2011^a

4.4 Estandarización de Protocolo de PCR Multiplex-Ready

Se optimizó el protocolo de PCR Multiplex-Ready, para mejorar la eficiencia de amplificación en la evaluación de los genotipos del banco de germoplasma, en base a la metodología descrita por Hayden *et al.* (2008a). Este consiste en el uso de dos sets de partidores, uno específico para cada marcador con una secuencia inespecífica (F: 5' ACGACGTTGTAAAA 3' y R: 5' CATTAAGTTCCCATTA 3') y un set general el cual se encuentra marcado con fluoróforos, los cuales se encuentran descritos en la figura 2.

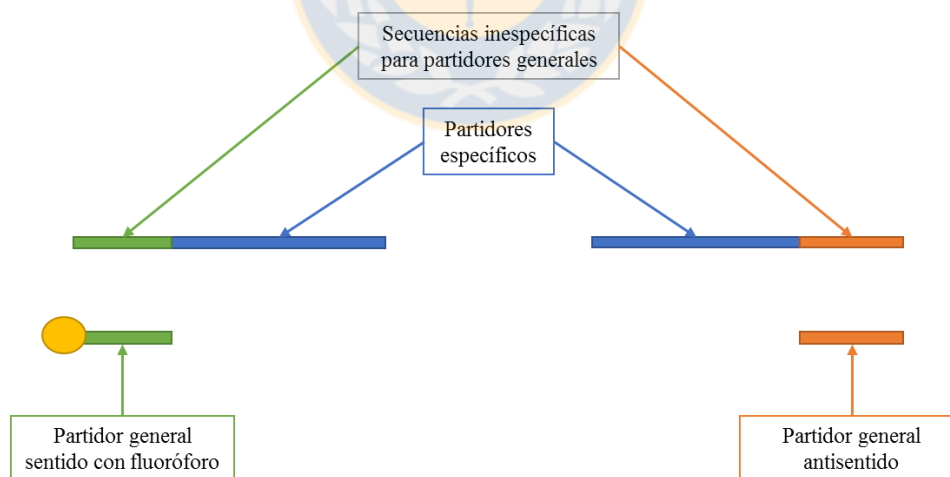


FIGURA 2. Descripción de los partidores utilizados en el protocolo de PCR Multiplex-Ready. El primer set de partidores consiste en los partidores específicos para cada marcador, más una secuencia inespecífica predeterminada para el partidor sentido y una para el partidor antisentido. El segundo set de partidores generales constan de una secuencia complementaria a las secuencias inespecíficas. El partidor general sentido se marcó con fluoróforos. Fuente: Elaboración propia.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μ l, con 20 ng de ADN genómico, 1X Reaction buffer (10X PCR Buffer, Invitrogen, USA), 25 nM de partidores tag con fluoróforo VIC (Thermo Fischer, USA), 1,5 nM de MgCl₂ (Invitrogen, USA), 8 μ g BSA (bovine serum albumin, Thermo Scientific, USA), 200 μ M de dNTPs, 0,5 U Platinum *Taq* (Invitrogen, USA), una de cuatro posibles concentraciones de partidores específicos de cada Marcador SSR (20 nM, 40 nM, 60 nM y 80 nM) y agua nanopura para completar el volumen. Las condiciones de PCR también se basaron en el protocolo descrito por Hayden *et al.* 2008a, y consistió en: una desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 20 ciclos de: desnaturalización a 92°C por 30 s, annealing a 63°C por 90 s y extensión a 72°C por 60 s; 40 ciclos de: desnaturalización a 92°C por 15 s, annealing a 54°C por 30 s y extensión 72°C por 60 s; y con una extensión final a 72°C por 10 min. Los ensayos de concentración de partidore específico se realizaron en 4 accesiones: CHA, MAN, CHI y 3ST.

Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar su exitosa amplificación. Luego se evaluaron mediante electroforesis capilar en un equipo ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), con un tiempo de inyección de 10 s y 15,000 V, y que se corrió a 13.000 V en un capilar de 36 cm, en el Laboratorio de Secuenciación del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción. En base a la intensidad de los “peaks” cromatográficos, se asignó uno de tres fluoróforos posibles, PET a los marcadores que presentaron una intensidad alta, VIC a los que presentaban una intensidad baja, y finalmente FAM a los que presentaban una intensidad intermedia, de acuerdo a que fluoróforos tienen mayor sensibilidad de detección. También, se determinó la cantidad de partidores específicos según cual era la cantidad mínima de partidore necesaria para obtener bandas claras y evitar la presencia de artefactos.

4.5 Evaluación de marcadores en el banco de germoplasma

Los 38 marcadores seleccionados se amplificaron mediante PCR Multiplex-ready (Hayden *et al.*, 2008a), con la cantidad de partidore específico determinado durante la optimización para cada uno de los marcadores, y con el fluoróforo asignado, en las 54 accesiones de *F. chiloensis* incluidas en el estudio. Cada marcador se amplificó en una reacción de PCR independiente.

Luego, se procedió a mezclar los productos de PCR, los cuales se agruparon de a 3 productos de PCR, cada uno procedente de la misma accesión y que posean uno de los 3 distintos fluoróforos utilizados en el estudio (FAM, VIC o PET).

Los productos de PCR combinados se evaluaron mediante electroforesis capilar, en las mismas condiciones utilizadas para la optimización del protocolo. Los resultados se analizaron utilizando el software, GeneMapper® (ver 4.0, Applied Biosystems, USA), utilizando una metodología automática para la detección de alelos en base a los "peaks" cromatográficos, los cuales se ajustaron de forma manual. De esta forma, se removieron los stutter, múltiples bandas generadas a partir de un solo marcador producto de errores de la ADN polimerasa (Holton, 2001), y otros artefactos de la amplificación según lo señalado por Pfeifer *et al.* (2011). Los alelos detectados para cada marcador se convirtieron a un sistema binario, donde la ausencia de un alelo se tipificó como (0) o presente con valor (1) (Brunings *et al.*, 2010).

4.6 Electroforesis en gel de agarosa

Las evaluaciones mediante electroforesis en gel de agarosa se realizaron en geles al 3% (p/v). Se cargaron directamente 2 µl de producto de PCR, mezclados con 0,5 µl de buffer de carga. Para la estimación del tamaño de bandas se cargó en el gel 2 µl de un marcador de peso HyperLadder IVTM (Bioline, USA), que marca el tamaño cada 100 bp. Las muestras cargadas en geles se corrieron en cámaras de electroforesis, con buffer TAE 1X, durante 90 min a 70 v con una fuente de poder BioVolt 300V (Select BioProductsTM).

La documentación de los geles se realizó con una cámara digital (Cannon PowerShot ELPH320HS), en exposición lenta por 8 s. Las fotografías se evaluaron con el programa PhotoScape (MOOII TECH).

4.7 Diversidad genética

El nivel de diversidad genética se determinó utilizando el paquete de análisis genético GenAlEx (ver. 6.5; Peakall y Smouse, 2006; Peakall y Smouse, 2012), como complemento para Microsoft Excel[®]. Los parámetros a evaluar en cada locus de microsatélite fueron el número de alelos totales (N_A), número de alelos efectivos (N_E), índice de Shannon (S), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (H_e). Estos valores se establecieron para cada una de las poblaciones putativas, como para los grupos genéticos sugeridos por el análisis de estructura genética.

4.8 Estructura genética

Para identificar los loci que no cumplan el criterio de neutralidad (outliers) entre todos los marcadores SSR, se utilizó el programa online LOSITAN (Antao *et al.*, 2008) según la aproximación propuesta por Excoffier *et al.* (2009). Los loci outliers se removieron del análisis de estructura poblacional. La estructura genética se infirió utilizando el procedimiento bayesiano, mediante el programa STRUCTURE (ver. 2.3.4; Pritchard *et al.*, 2000). Se asumió el modelo agregado (admixed model) y las frecuencias alélicas correlacionadas para analizar los datos sin información previa de poblaciones.

Las probabilidades posteriores se determinaron utilizando el método de la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) con un periodo de burn-in de 100.000 y 1.000.000. Se realizaron 3 corridas, configurando K (donde K es el número de grupos genéticos distintos y diferenciados, aún desconocido) de 1 a 10, donde se determinó el valor de similitud promedio para cada K. El valor óptimo de K fue calculado utilizando un método descrito por Evanno *et al.* (2005), utilizando el software online STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHolt, 2012). Este método utiliza un estadístico *ad hoc* (ΔK), cuyo valor modal de su distribución denota el valor real de K.

La estructura genética de las accesiones de *F. chilensis* también se analizó mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando el paquete GenAlEx 6.5 para el software

Microsoft Excel (Peakall y Smouse, 2006; Peakall y Smouse, 2012). Este método de ordenación se inicia con una matriz de similitudes o diferencias entre un conjunto de individuos, generando una representación gráfica de los datos.

Para analizar la diferenciación genética entre los grupos genéticos, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; $P < 0.05$; Excoffier *et al.*, 1992) mediante el paquete GenAlEx 6.5 para el software Microsoft Excel (Peakall y Smouse 2006, Peakall y Smouse 2012), con los grupos genéticos distintos (K) determinados en STRUCTURE y la agrupación *a priori* de los individuos según región climática, para examinar la diversidad genética dentro y entre grupos genéticos. Mediante esta AMOVA se obtuvo el estadístico ϕ_{ST} , un análogo del mejor conocido F_{ST} (Holsinger *et al.*, 2009).

4.9 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (LD) se estimó como la correlación de frecuencias alélicas cuadradas (r^2) utilizando TASSEL v.5.0 (Bradbury *et al.*, 2007). La significancia de los desequilibrios de ligamiento de los pares (valores P) se computó utilizando 1.000 permutaciones. Los valores de r^2 se calcularon entre pares de marcadores pertenecientes a un mismo grupo de ligamiento. El valor crítico de r^2 se determinó según lo descrito por Breseghello y Sorrells (2006) y Laidò *et al.* (2014), sin considerar si están en el mismo cromosoma. Para ello, los estimados de r^2 no ligados fueron transformados a su raíz cuadrada para aproximarse a una variable de distribución normal, y luego se calculó el percentil 95 de esa distribución, punto desde el cual es seguro asociar el LD al ligamiento genético entre los loci. El decaimiento de r^2 fue calculado utilizando SAS-STAT® (<http://www.sas.com>) según la esperanza de r^2 entre sitios adyacentes descrita por Hill y Weir (2002).

Para visualizar el cambio del LD en función de la distancia genética, la información de los marcadores ligados se obtuvo desde sus respectivas referencias de posición en los trabajos de Sargent *et al.* (2012) y Zorrilla-Fontanesi *et al.* (2011a). El decaimiento de r^2 en función de la distancia genética se graficó utilizando Microsoft Excel, donde solo se incluyeron los valores de r^2 con $P < 0,001$. El valor de r^2 para la distancia de 0 cM se asumió como 1, según lo descrito

por Bradbury *et al.* (2007). Se obtuvo una curva para describir la tendencia del decaimiento del LD mediante un modelo de regresión no lineal, que permite observar la correlación general entre la distancia genética de los marcadores de un mismo cromosoma y el LD.



V. RESULTADOS

5.1 Extracción de DNA

Las extracciones de ADN de cada individuo, revisadas en gel de agarosa al 0,7%, presentaron una alta concentración. Sin embargo, en las muestras se observa degradación del ADN, el cual no tuvo mayor influencia en las reacciones de PCR, ya que se pudieron llevar a cabo sin inconvenientes. En la figura 3, se observa una muestra representativa de las extracciones realizadas.



FIGURA 3. Integridad de ADN de las extracciones realizadas en las 54 accesiones de *F. chiloensis*, comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa (0,7%). λ : marcador de concentración de ADN (20 ng/ μ l). Fuente: Elaboración propia.

5.2 Optimización del protocolo de PCR multiplex-ready

En la mayor parte de los marcadores, se comprobó que una baja concentración de partidor específico (20 nM o 40 nM) es suficiente para la amplificación de los fragmentos, evitando la amplificación de artefactos, como se puede observar en la figura 4. En la tabla 3, se listan las concentraciones utilizadas para cada marcador específico durante las siguientes evaluaciones.

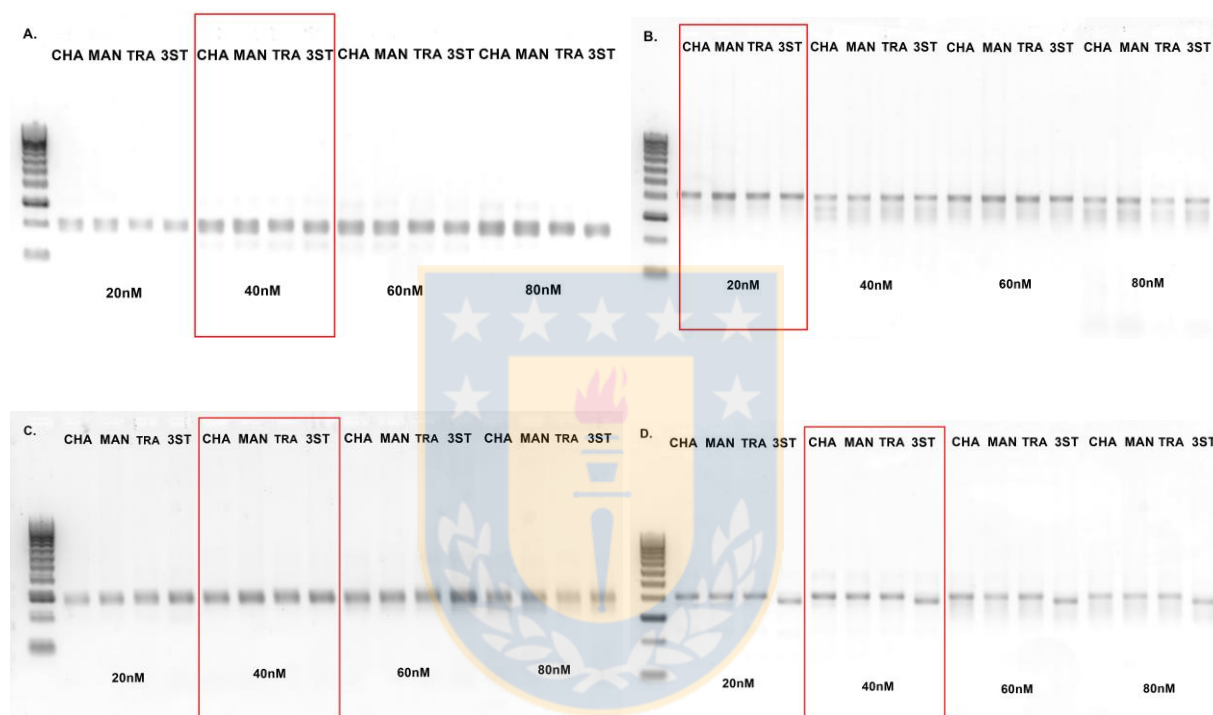


FIGURA 4. Geles de agarosa (2% p/v) de los productos de PCR de la optimización del protocolo de PCR multiplex-ready. A: ChFaM023, B: COBRA, C: BFACT029 y D: FvH4045. En los 4 marcadores las accesiones utilizadas fueron CHA: Chanco, MAN: Manzanar, TRA: Trancas y 3ST: 3 esteros. Fuente: Elaboración propia.

Una vez establecida la concentración de marcador a utilizar, se procedió a la evaluación mediante electroforesis capilar. En esta se determinó según la intensidad relativa que fluoróforo se utilizaría para cada marcador. En la figura 5, se muestran ejemplos de marcadores asignados para cada uno de los fluoróforos, donde VIC se asignó a los marcadores con menor intensidad de fluorescencia (alrededor de 200), PET a los de mayor intensidad (sobre 800) y FAM a los de una intensidad intermedia (entre 200 y 800). En la tabla 3, se encuentra el fluoróforo asignado para cada marcador

TABLA 3. Concentraciones óptimas para los partidores específicos y fluoróforos asignados para usar en las reacciones de PCR multiplex-ready para cada uno de los 39 marcadores en el estudio. Fuente: Elaboración propia.

N°	Marcador	Marcador	Fluoróforo
1	ChFaM023	40nM	VIC
2	EMFn121	40nM	PET
3	EMFn181	40nM	FAM
4	EMFvi136	40nM	FAM
5	ChFaM160	40nM	PET
6	ChFaM044	40nM	FAM
7	CFVCT027	40nM	FAM
8	FvH4015	40nM	PET
9	CFACT084	40nM	VIC
10	FvH4026	40nM	PET
11	CO816938	40nM	PET
12	ARSFL004	40nM	FAM
13	BFACT045	40nM	PET
14	ARSFL022	40nM	PET
15	CO818002	40nM	FAM
16	FvH4079	40nM	VIC
17	FvH4019	40nM	PET
18	BFACT029	40nM	VIC
19	CFACT087	40nM	FAM
20	FvH4156	40nM	FAM
21	FvH4178	40nM	PET
22	EMFn153	40nM	FAM
23	BFACT018	40nM	FAM
24	EMFn214	20nM	PET
25	COBRA	20nM	VIC
26	FvH4045	20nM	VIC
27	FvH4025	20nM	VIC
28	FvH4115	20nM	VIC
29	FvH4123	20nM	VIC
30	FvH4089	20nM	FAM
31	ChFaM022	40nM	PET
32	ARSFL010	40nM	VIC
33	CO813853	40nM	PET
34	BFACT036	40nM	PET
35	BFACT002	40nM	FAM
36	FvH4160	40nM	VIC

(Continuación tabla 3)

37	ChFaM196	40nM	FAM
38	CFVCT032	40nM	VIC
39	CX661803	40nM	VIC

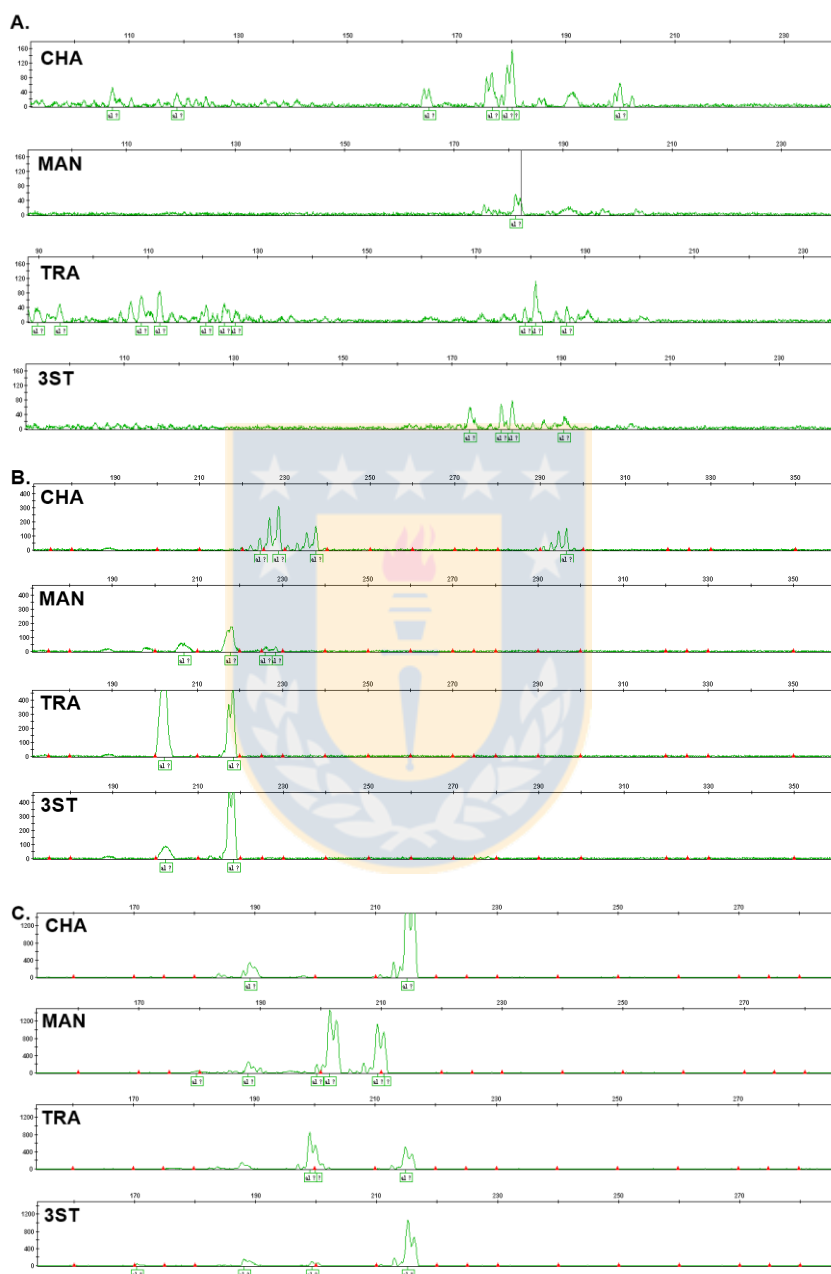


FIGURA 5. Electroforesis capilar de los productos de PCR para la optimización del protocolo PCR multiplex-ready. A: ChFaM023 (asignado VIC), B: EMFn181 (asignado FAM), C: EMFn121 (asignado PET). Fuente: Elaboración propia.

5.3 Evaluación de marcadores en el banco de germoplasma

De los 39 marcadores seleccionados, solo 38 pudieron ser evaluados mediante electroforesis capilar, debido a que en numerosos intentos, el marcador EMFvi136 no mostró alelos en la electroforesis capilar a pesar de que el marcador es visible en los geles de agarosa. En la figura 6 se puede observar una muestra representativa de los electroferogramas finales, donde se señala los peaks seleccionados como alelos. En la figura 7 se puede observar un gel de agarosa representativo de la PCR de EMFvi136 y de la respectiva electroforesis capilar de los mismos productos de PCR.

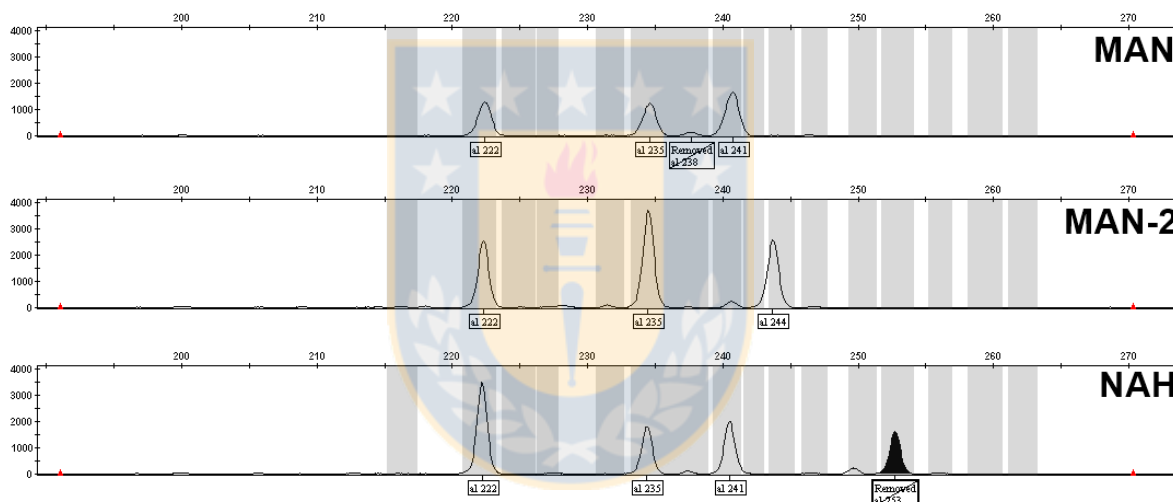


FIGURA 6. Electroforesis capilar de los productos de PCR del marcador CO816938 en 3 accesiones de *F. chiloensis*. Las marcas bajo cada peak señalan los alelos detectados por el programa. Los denotados como “removed” fueron remociones manuales de peaks considerados posibles artefactos. Fuente: Elaboración propia.

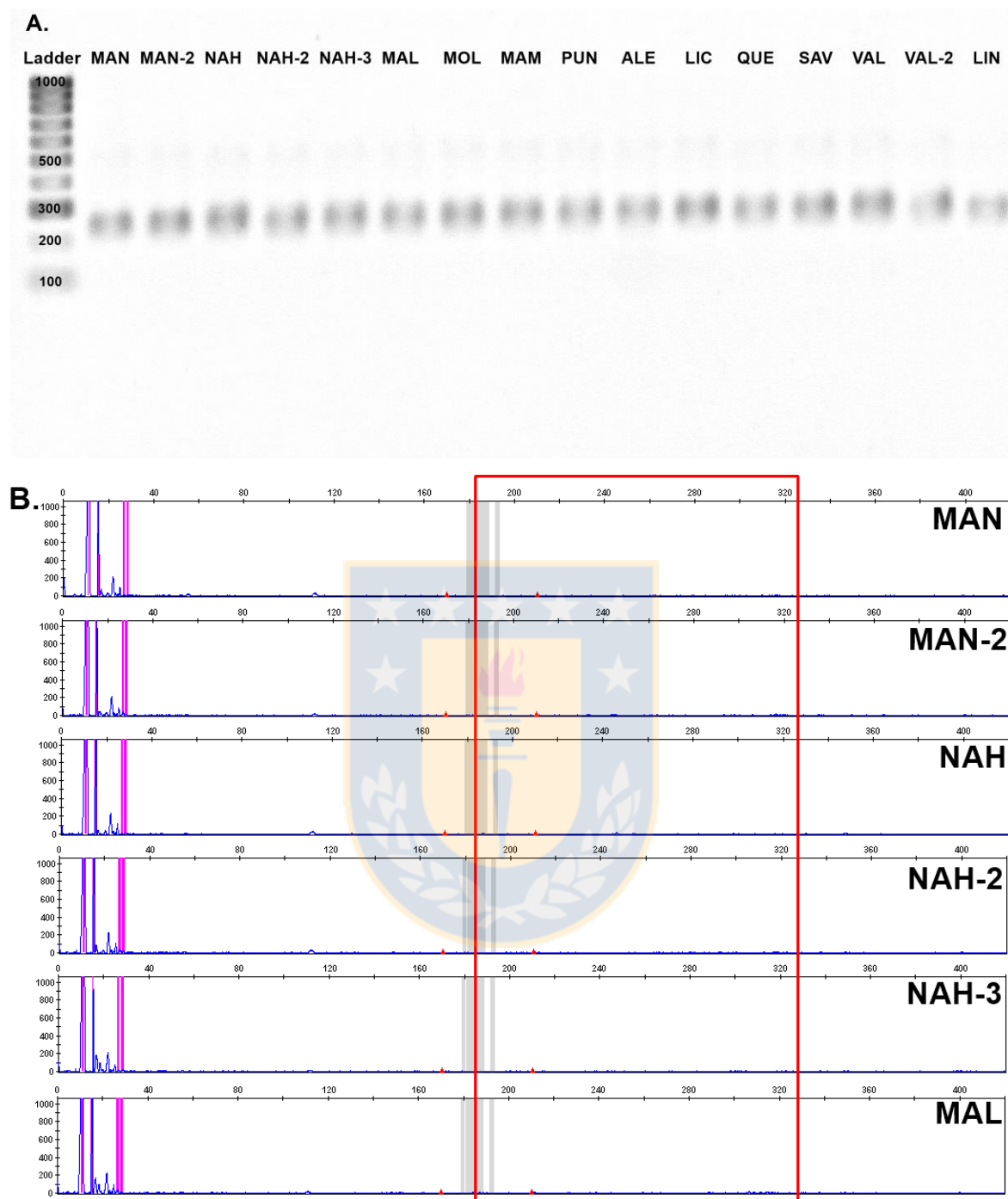


FIGURA 7. Electroforesis en gel de agarosa y electroforesis capilar de los productos de PCR del marcador EMFvi136. A: Productos de PCR exitosamente amplificados en 16 accesiones de *F. chiloensis*. B: electroferograma de los productos de PCR en 6 accesiones. El recuadro denota el espacio donde debería haber alelos según el gel de agarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.4 Estadísticos de diversidad genética

Los 38 marcadores genotipados produjeron un total de 259 alelos entre las 54 accesiones. Con dichos alelos procesados como marcadores binarios, se calcularon los estadísticos de diversidad genética para cada una de las poblaciones putativas (Tabla 4).

El tamaño de los alelos varió entre las 112 y las 342 bp, con un promedio de alelos efectivos (N_E) de 1,23, con un rango entre 1 y 1,99, lo cual es esperable para datos analizados como datos binarios. En el análisis con las poblaciones putativas, el valor promedio del índice de diversidad de Shannon (S) fue de 0,28. En tanto, la heterocigocidad esperada (H_E) fue de 0,16 y la heterocigocidad esperada no sesgada (uH_E) fue de 0,17. El valor promedio de loci polimórficos (P) fue de 67,6%, con valores que oscilaron entre 53,7 y el 75,86%.

TABLA 4. Resumen de estadísticos de la variación genética de las 54 accesiones de *F. chiloensis* utilizando las 259 bandas producidas por los 38 marcadores SSR. Las abreviaciones MT, MF, HP y P representan Mediterráneo templado y marino, marino fresco, marino húmedo patagónico, Mediterráneo frío, y polar alpino tundra, respectivamente, según las regiones climáticas descritas por Lavín *et al.* (2000). Fuente: Elaboración propia.

Población putativa	Tamaño de muestra	N° de alelos (\pm ES)	Alelos efectivos (\pm ES)	Loci polimórficos (%)	Heterocigocidad esperada (\pm ES)	Índice de Shannon (\pm ES)
MT	13	1,43 \pm 0,06	1,24 \pm 0,02	69	0,16 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02
MF	13	1,57 \pm 0,06	1,23 \pm 0,02	76	0,16 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01
HP	11	1,45 \pm 0,06	1,22 \pm 0,02	71	0,16 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02
M	6	1,13 \pm 0,06	1,27 \pm 0,02	54	0,15 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02
P	11	1,39 \pm 0,06	1,24 \pm 0,02	68	0,16 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02
Total/ Promedio	54	1,39\pm0,06	1,24\pm0,02	68	0,16\pm0,01	0,26\pm0,01

5.5 Análisis de estructura poblacional

5.5.1 Detección de loci bajo selección

El software LOSITAN estima los loci que se encuentran bajo selección basado en las frecuencias alélicas para cada loci. El análisis asume que los loci relacionados a adaptaciones locales deberían tener un valor alto de F_{ST} mientras que los que se encuentran bajo selección de

equilibrio deberían tener un F_{ST} bajo. En general, estos loci no son considerados para cálculos de la estructura de poblaciones, y en este estudio, 56 de 259 loci se encontraban bajo selección (21,6%), los cuales se excluyeron del análisis de estructura de poblaciones. En la figura 8, se observa los loci bajo selección, obtenidos en LOSITAN.

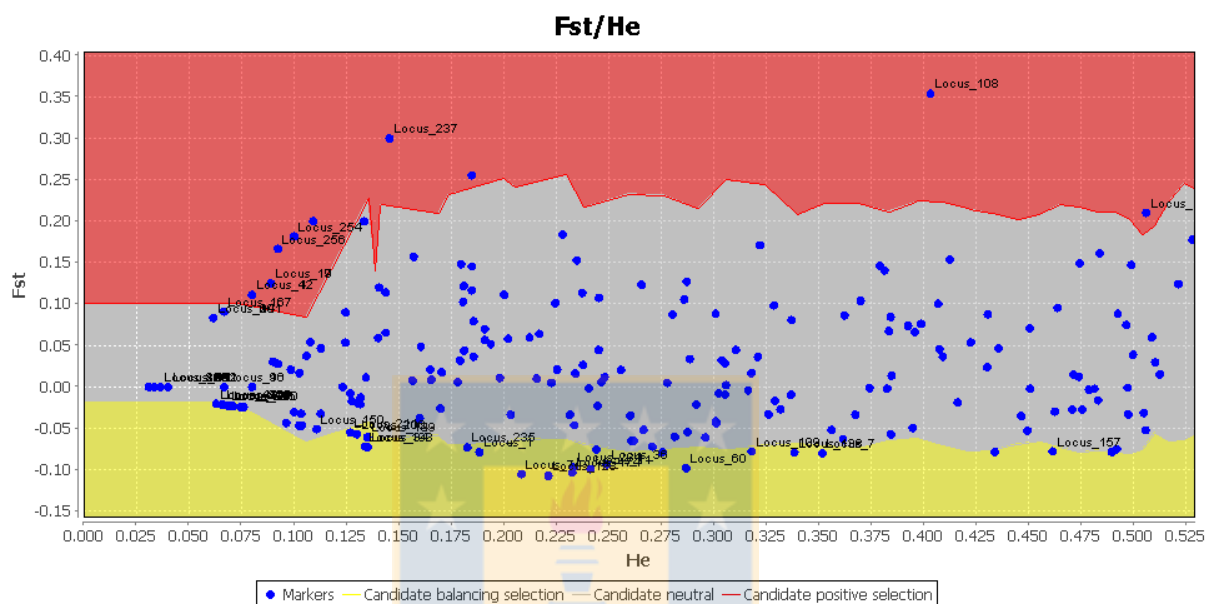


FIGURA 8. Resultados del análisis del programa LOSITAN. Los marcadores en las zonas de color rojo y amarillo corresponden a los loci bajo selección. En la zona roja se marcan los loci bajo selección positiva y en amarillo los loci bajo selección balanceada. Fuente: Elaboración propia.

5.5.2 Análisis de estructura genética

Para chequear la hipótesis de estructuración genética, se realizó un análisis Bayesiano considerando un modelo admixture. Utilizando el método de Evanno *et al.* (2005), se obtuvo un K óptimo de 3 (Figura 9). En la Figura 10, se presenta un gráfico de barras con el análisis admixture para $K = 3$. Para que una accesión se considerara como parte de un grupo genético, se consideró a los individuos que compartían una pertenencia al grupo genético mayor a un 70% (Yoon *et al.* 2012). El grupo genético 1 está compuesto por 11 accesiones, el grupo genético 2 está compuesto por 11 accesiones y el grupo genético 3 está compuesto por 17 accesiones, mientras que las 15 accesiones restantes corresponden a mezclas entre los distintos grupos genéticos. Los grupos genéticos establecidos siguen un patrón general, donde el grupo genético

1 (negro) se encuentra predominantemente en la zona costera, mientras que el grupo genético 3 (gris oscuro) se ubica principalmente en la cordillera (Figura 11). El grupo genético 2 (gris claro), consiste predominantemente por individuos de la isla de Chiloé y sus alrededores.

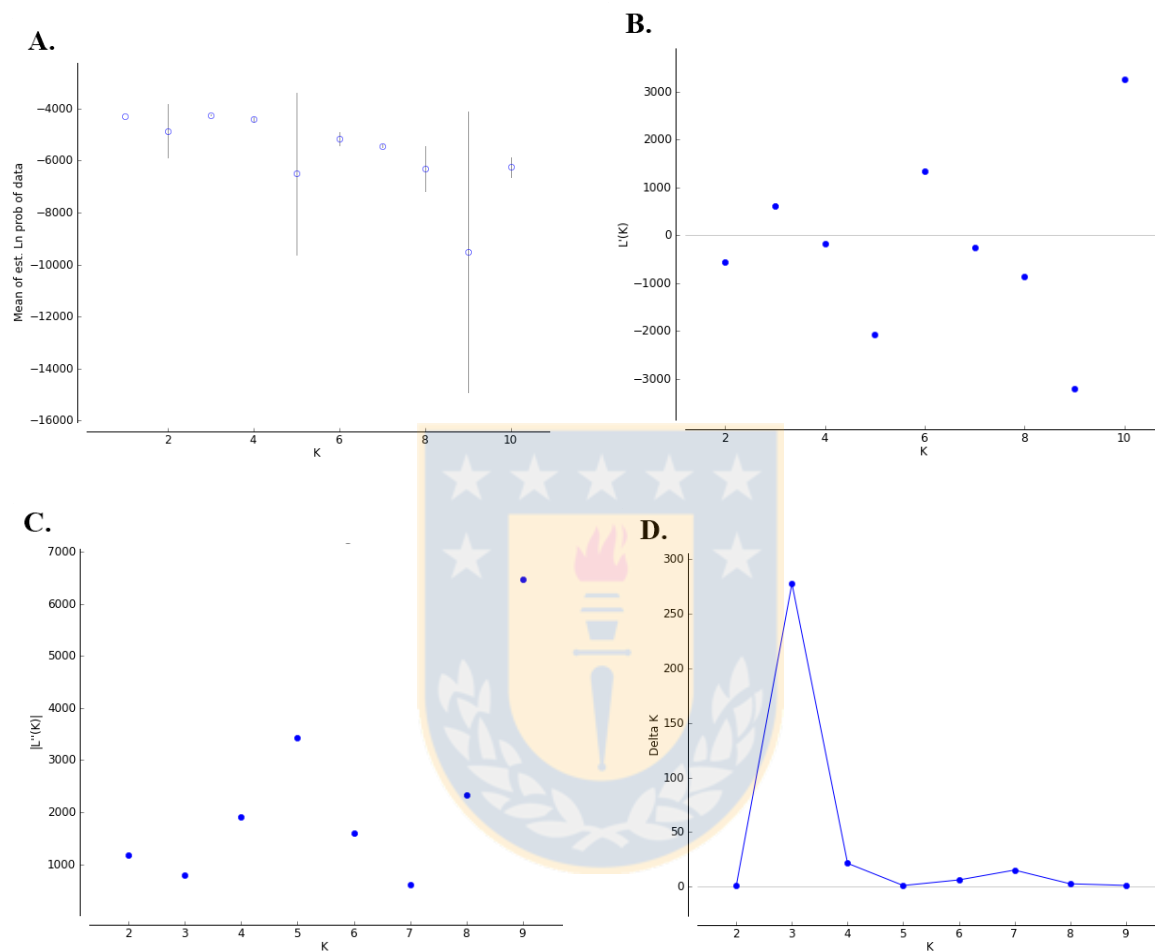


FIGURA 9. Gráficos K = 1-10 obtenidos mediante el análisis de STRUCTURE HARVESTER. En estos se observa: A. La probabilidad de la existencia de K grupos ($L(K)$). B. promedio de la tasa de cambio de la distribución de la probabilidad de K ($L'(K)$). C. valor absoluto de la tasa de cambio segundo orden de la distribución de probabilidad de K ($L''(K)$). D. valor promedio de la tasa de cambio de segundo orden ($L'''(K)$), dividido por el error estándar de la distribución de $L(K)$, valor determinado como ΔK , cuyo valor modal determina el valor real de K. Fuente: Elaboración propia.

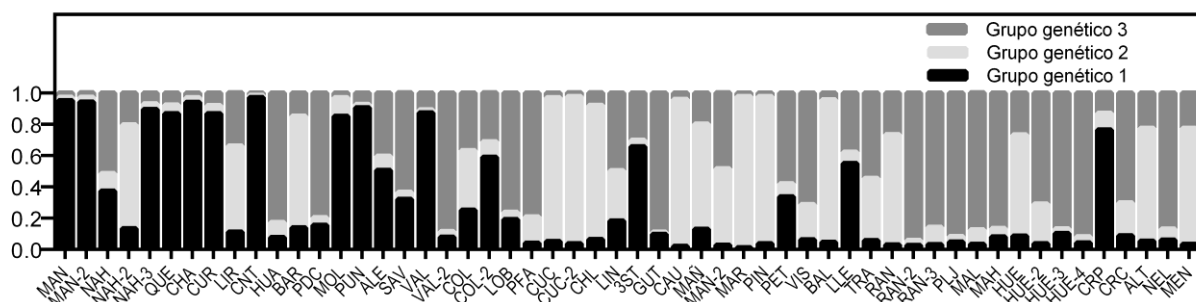


FIGURA 10. Gráfico de barras del análisis admixture de STRUCTURE donde $K = 3$, de las 54 accesiones de *F. chilensis*. Fuente: Elaboración propia.

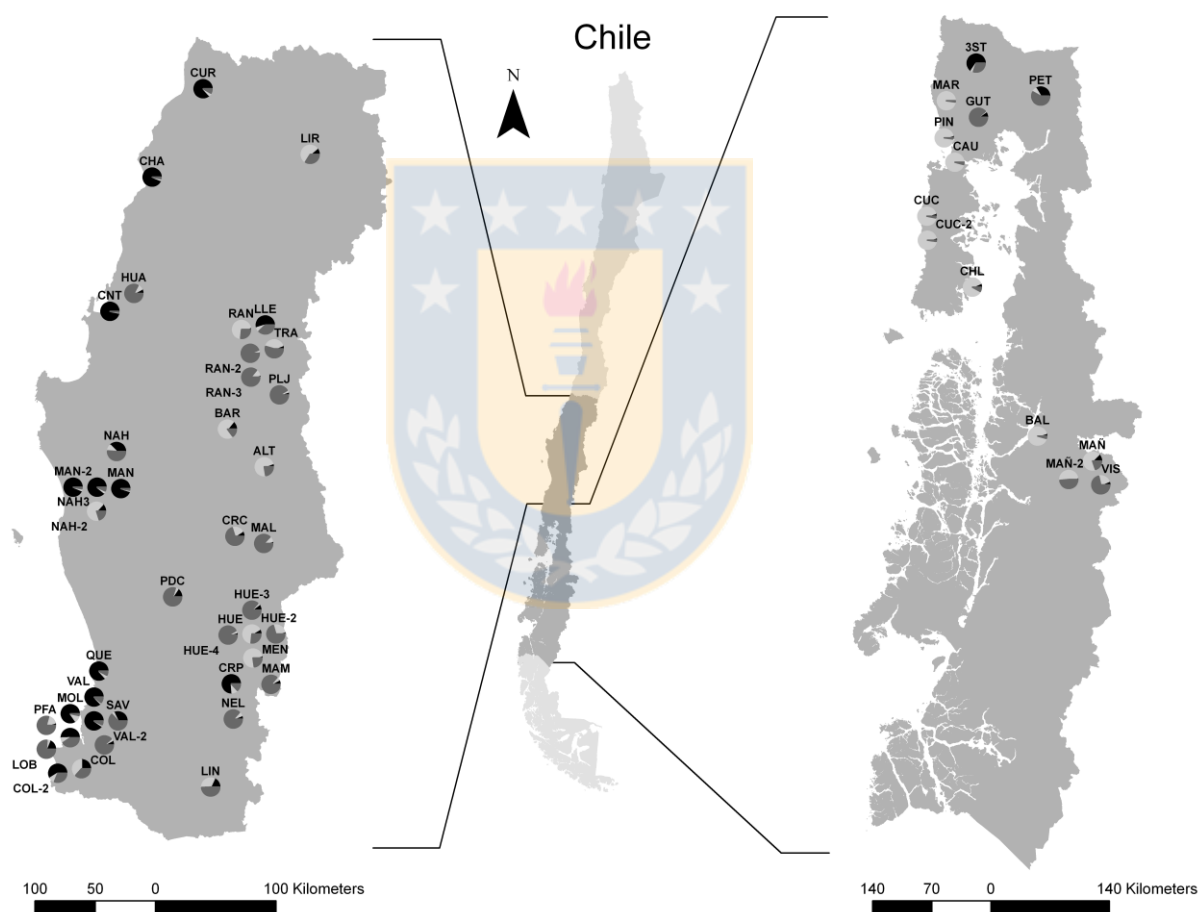


FIGURA 11. Mapa de las 54 accesiones de *F. chilensis* con sus respectivos porcentajes de pertenencia a los grupos genéticos establecidos por el análisis de STRUCTURE. Grupo genético 1 (Negro), grupo genético 2 (gris claro) y grupo genético 3 (gris oscuro). Fuente: Elaboración propia.

5.5.3 Estadísticos de diversidad genética para los grupos genéticamente diferenciados

En base a los tres grupos genéticos predichos por el análisis de STRUCTURE, se realizó la evaluación de los parámetros de diversidad genética, en donde sólo se consideró a los individuos que tuviesen un porcentaje de pertenencia mayor al 70%. Del total de accesiones evaluadas, 39 se asignaron a uno de los grupos genéticos, mientras que 15 se consideraron mezclas entre estos, con distintos niveles de pertenencia a cada uno de los grupos. El grupo genético 1 corresponde a 11 accesiones, el grupo genético 2 a 11 accesiones y el grupo genético 3 a 17 accesiones. Los valores de diversidad genética fueron similares a los obtenidos en las poblaciones putativas (Tabla 5).

TABLA 5. Resumen de estadísticos de la variación genética de las 54 accesiones de *F. chiloensis* utilizando las 259 bandas producidas por los 38 marcadores SSR, en los grupos genéticos predichos por el análisis de STRUCTURE. Fuente: Elaboración propia.

Población putativa	Tamaño de muestra	Nº de alelos (\pm ES)	Alelos efectivos (\pm ES)	Loci polimórficos (%)	Heterocigocidad esperada (\pm ES)	Índice de Shannon (\pm ES)
G. genético 1	11	1.34 \pm 0.06	1.24 \pm 0.02	64	0.16 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02
G. genético 2	11	1.42 \pm 0.06	1.22 \pm 0.02	69	0.15 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02
G. genético 3	17	1.64 \pm 0.05	1.24 \pm 0.02	80	0.17 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01
Total/ Promedio	39	1.47 \pm 0.04	1.23 \pm 0.01	71	0.16 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01

5.6 Desequilibrio de ligamiento

Se encontró un LD significativo ($P < 0,1$) en 3,752 pares de loci, donde los valores de r^2 variaron entre 0,001 y 0,652. La relación observada entre las medidas de las mediciones de LD en los 54 individuos para todos los alelos pertenecientes a los marcadores se muestran en la Figura 12. En éste se observa que el decaimiento del desequilibrio, medido como r^2 , fue relativamente alto en distancias cortas y declinó rápidamente con la distancia. El valor crítico de r^2 en donde el LD es probablemente causado por ligamiento físico, determinado como el percentil 95 de la distribución de r^2 , se estimó en $r^2 = 0,24$. La intersección de la curva ajustada de valores de r^2 con el valor umbral, se consideró una estimación del rango del desequilibrio de ligamiento, el

cual fue determinado en aproximadamente 4 cM. Dieciséis pares de loci (0,4%) fueron mayores que el valor umbral, y por tanto, se encuentran en LD.

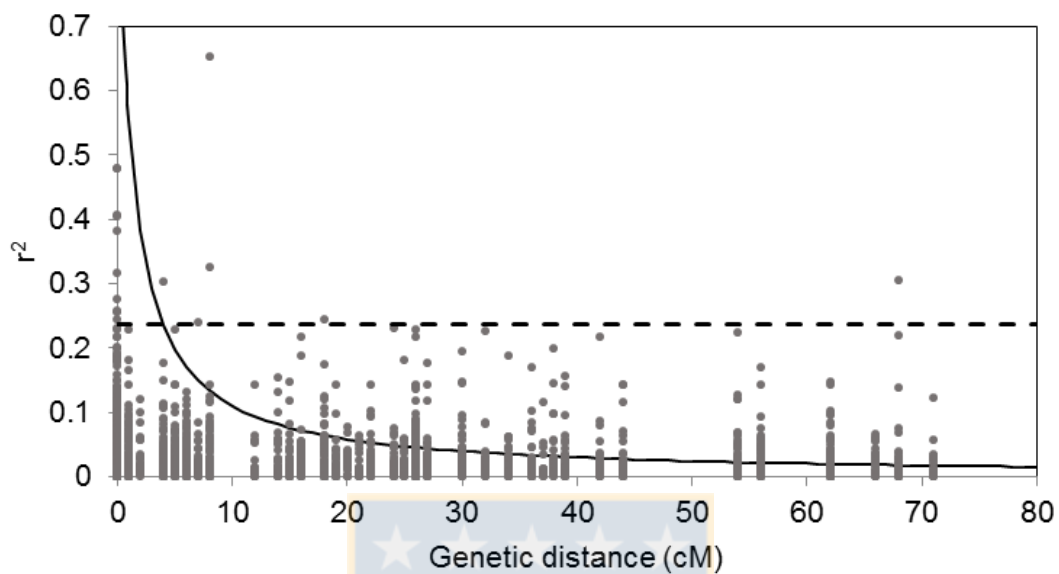


FIGURA 12. Gráfico de puntos del desequilibrio de ligamiento (r^2) de todo el genoma en 54 accesiones de *F. chiloensis*. La línea horizontal corresponde al percentil 95 de la distribución de r^2 no ligado, lo cual fue determinado como el valor crítico de r^2 . Fuente: Elaboración propia.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Optimización del protocolo de PCR Multiplex-Ready

Para la ejecución de este estudio, previamente se habían seleccionado 95 marcadores previamente reportados en *F. ×ananassa* y de los cuales 78 habían sido exitosamente transferidos, lo cual se encuentra dentro del rango de transferibilidad entre especies del género *Fragaria*, según lo señalado en literatura (Folta y Davis, 2006; Dirlewanger *et al.*, 2009). Sin embargo, si bien someter a los marcadores al protocolo de PCR multiplex-ready fue exitoso para 38 de los 39 marcadores (97%), lo cual se encuentra dentro del rango de éxito descrito por los autores del protocolo (92%), la intensidad de los peaks cromatográficos, obligó a la modificación de la cantidad de marcadores analizados mediante electroforesis capilar por pocillo.

De acuerdo a Hayden *et al.* (2008a) se sugiere mezclar productos de PCR en una proporción 2:2:1:2 para los fluoróforos: VIC, FAM, NED y PET, respectivamente. En tanto, en este estudio se utilizó una proporción 1:1:2 de VIC, FAM y PET, dejando de lado el uso del fluoróforo NED debido a la baja señal percibida por el equipo de electroforesis capilar, según se comprobó en ensayos preliminares. Aún con la menor cantidad de productos de PCR distintos por pocillo de electroforesis, los resultados en general fueron de una intensidad de fluorescencia más baja, los cuales estuvieron en el rango de los 400 a 1000 unidades relativas de fluorescencia (rfu), mientras lo esperado debía ser entre 2000 y 15000 rfu (Hayden *et al.*, 2008b). Dentro de las razones que pudiesen afectar la intensidad obtenida se encuentran la optimización de la extracción de ADN, por la presencia de posibles contaminantes (Demeke y Jenkins, 2010). Además, la eficiencia de la PCR es una de las limitantes descritas para métodos de PCR con partidores universales, pero es aceptado como alternativa debido a su eficiencia en costos (Blacket *et al.*, 2012). A pesar de estas limitantes, la concentración de los partidores y el fluoróforo utilizado permitió realizar una adecuada identificación de los alelos, de stutter y otros artefactos, que presentaban el patrón usual, donde los principales corresponden al producto de PCR, mientras que las bandas de stutter se encuentran en tamaños cercanos, y decrecen en intensidad entre más distante sean estas bandas del producto de PCR (Perlin *et al.*, 1995).

6.2 Estadísticas de los marcadores microsatélite

Los 38 marcadores utilizados generaron un total de 259 alelos, lo que representa un total de 6,8 alelos por marcador evaluado. Estas cifras son mayores a las encontradas en otros individuos del género *Fragaria* de menor ploidía, como *F. vesca*, donde se encontró un promedio de 4,9 alelos por locus, habiendo evaluado un total de 31 locus (Hadonou *et al.*, 2004), sin embargo es menor a otras especies silvestres de la misma ploidía, como *F. virginiana*, donde se reportó un promedio de 12 alelos por locus, habiendo evaluado 8 locus (Ashley *et al.*, 2003). El marcador COBRA fue altamente monomórfico por lo que no se sugiere su uso para estudios de diversidad genética en la especie. El marcador EMFvi136 no es compatible con el protocolo de PCR multiplex-ready, ya que el partidador general con fluoróforo no amplificó durante la reacción de PCR, por lo que no es sugerido en futuros estudios que utilicen la misma metodología.

La heterocigocidad esperada (H_E) fue en promedio de 0,16, lo cual es un valor similar a lo encontrado en *F. vesca* que tiene una $H_E = 0,14$ (Smari, 2015), pero es menor a los resultados obtenidos por Carrasco *et al.* (2007) en *F. chiloensis*, donde se reportó $H_E = 0,24$. Los valores reportados en *F. chiloensis* son bajos en comparación a otras especies octoploides del género *Fragaria*, como *F. xananassa* que tiene un $H_E = 0,70$ (Yoon *et al.*, 2012) y *F. virginiana* con un $H_E > 0,80$ (Ashley *et al.*, 2003). Sin embargo, en ambos casos los marcadores habían sido previamente seleccionados sólo por su alto grado de polimorfismo, y contemplan muestras de regiones geográficas más amplias, por lo que no son resultados directamente comparables. En tanto, las diferencias entre los resultados reportados pueden deberse a las diferencias en el muestreo y el tipo de marcador utilizado (Nybom, 2004).

En tanto, el índice de Shannon (S), que expresa la riqueza alélica por población, muestra un promedio de 0,26 para la especie. Tanto para las poblaciones putativas determinadas como para los grupos genéticos determinados *a posteriori*, la variación entre los índices para cada población fue bajo (entre 0,24 y 0,28), siendo el grupo genético 3, el que concentraría la mayor diversidad genética ($H_E = 0,17$ y $S = 0,28$). Estos valores se encuentran dentro de lo que usualmente se reporta para plantas que se pueden reproducir de forma tanto sexual como

vegetativa, evaluadas mediante marcadores dominantes (Nybom, 2004), lo cual se relaciona a nuestros datos, ya que los marcadores SSR fueron analizados como datos binarios.

Cabe destacar que si bien muestras de 5 a 100 individuos producen resultados comparables, hay autores que señalan que con 20 a 30 individuos por poblaciones permiten capturar los alelos presentes en cada población (Pruett y Winker, 2008). Sin embargo, Sapra *et al.* (1998) determinó que en un estudio de tetraploides con respecto a los diploides es necesaria aproximadamente la mitad de individuos por población para poder capturar el mismo nivel de diversidad genética, tomando esto en consideración, la muestra estudiada contiene suficientes individuos por grupo genético para representar su diversidad.

Estos valores de diversidad genética, como la heterocigocidad y el número de alelos por locus podrían ser menores que en otras *Fragarias* octoploides debido a eventos de cuello de botella producidos por la acción antrópica. Esto coincidiría con los cambios en la distribución histórica de la especie, donde su presencia era mucho más extensa en la depresión intermedia del país a lo largo de toda su distribución, según se registra en las muestras archivadas en el herbario de la Universidad de Concepción, en comparación a las muestras colectadas en el trabajo de Mora *et al.* (2016), en el cual no se pudieron encontrar algunas de las localidades descritas por Lavín *et al.* (2000).

6.3 Análisis de estructura genética

El modelo admixture utilizado en STRUCTURE arrojó como resultado que existían tres grupos genéticos entre las accesiones evaluadas. Estos resultados, no fueron coincidentes con el análisis de coordenadas principales (PCoA; Figura 1-A). Si bien, es posible que debido a que los grupos genéticos no poseen grandes diferencias, según indica el análisis de la AMOVA, las accesiones se vean agrupadas principalmente en un punto del gráfico, con unas pocas muestras alejándose de este patrón general. De todas formas, el modelo admixture de STRUCTURE es capaz de dilucidar estructura poblacional incluso si los set de datos contienen bajos niveles de información (Hubisz *et al.*, 2009). Cabe destacar que el método de Evanno utilizado en STRUCTURE HARVESTER es afectado por el número de individuos y la cantidad de

marcadores utilizados en el estudio (Evanno *et al.*, 2005) y que por su naturaleza no existe un ΔK para $K=1$, por lo que es posible que no fuese detectado como una opción óptima. Carrasco *et al.* (2007), utilizando el modelo sin admixture de STRUCTURE, obtuvo un $K=2$ para una muestra representativa de accesiones chilenas de *F. chiloensis*, y fue adjudicado a las diferencias entre las formas botánicas. Dicho estudio encontró una diferenciación del 14,9% en la AMOVA, sin embargo, estas diferencias pueden haber estado influenciadas por el dispar tamaño entre ambas formas botánicas (Nybom, 2004).

En tanto, la diferenciación según latitudes de Carrasco *et al.* (2007) arrojó una diferenciación entre los distintos grupos genéticos de un 3%, similar al 4% obtenido en los 3 grupos genéticos de este estudio. Además, cabe destacar que los grupos genéticos descritos por STRUCTURE para nuestros datos se asemejan a la distribución de potenciales refugios en Chile durante la glaciación y las posteriores rutas de colonización que siguieron las especies luego de ésta (Sérsic *et al.*, 2011). El grupo genético 1 coincide con el refugio glacial de la costa, el grupo genético 3 coincide con el refugio glacial de la cordillera y el grupo genético 2 se encontraría en un lugar considerado uno de los puntos de quiebre que separan los refugios. Las muestras que pertenecen mayoritariamente al grupo genético 2 corresponden a las ubicadas en la isla de Chiloé y sus alrededores, y el cual es descrito como un punto de alta diversidad genética en plantas (Sérsic *et al.* 2011), por lo que debiesen ser el foco de un estudio más profundo.

En el caso de los grupos genéticos determinados por el análisis de STRUCTURE, la diferenciación entre las poblaciones es baja, siendo la mayor diferencia entre el grupo genético 1 (costa) y 3 (cordillera), donde hay un valor de ϕ_{ST} de 0.06 ($P \geq 0,001$). Por el contrario, los grupos genéticos 2 (Chiloé) y 3 (cordillera) mostraron la menor diferenciación con valor de ϕ_{ST} de 0.023 ($P \geq 0,001$).

6.4 Desequilibrio de ligamiento

A pesar de que la familia Rosaceae cuenta con numerosas especies de relevancia económica (Dirlewanger *et al.*, 2002), existen pocos reportes de datos de LD y estos suelen ser de pocas plantas y en loci específicos (Khan y Korban, 2012). Este es el caso del género *Fragaria*, donde

se reportaron 4 pares de loci en LD en individuos de *Fragaria vesca* subsp. *bracteata* (Li *et al.*, 2012), en un total de 11 marcadores SSR estudiados. En un estudio de cultivares de *F. ×ananassa* se reportaron 14 pares de loci en LD (Yoon *et al.*, 2012) en un total de 32 marcadores SSR. Contrariamente, en el presente estudio se encontraron 16 pares de loci en LD, sin embargo, no es un valor directamente comparable al resultado de Yoon *et al.* (2012) ya que no reportaron como determinaron su valor de umbral.

En *Prunus persica* se han reportado que el LD tiene un rango de 6 cM entre variedades chinas silvestres (Cao *et al.*, 2012), mientras que entre cultivares mejorados el rango de LD variaba entre los 13,3 y 15,2 cM (Aranza *et al.*, 2010), lo cual es atribuido a la capacidad de autopolinización de dichos cultivares, y el cuello de botella genético causado por las prácticas de mejoramiento. En general, el decaimiento del LD ocurre más rápido en especies de polinización abierta como *Zea mays* L. (Yan *et al.*, 2009) o *Helianthus annuus* L. (Liu y Burke, 2006). En tanto, especies sometidas a autocruzadas como *Arabidopsis thaliana* L. (Nordborg *et al.*, 2002) o *Glycine max* L. (Lam *et al.*, 2010), poseen un decaimiento más lento del LD. De misma forma, el decaimiento del LD es mayor en especies silvestres que en sus correspondientes parientes cultivados, entre las posibles causas se encuentran la historia evolutiva de los loci, los eventos de recombinación con individuos genéticamente distintos (Morrell *et al.*, 2005).

En comparación, otras especies como *Vitis vinifera* L., tienen un decaimiento rápido del LD a 2,7 cM (Barnaud *et al.*, 2010), lo cual también ha sido reportado en variedades cultivadas (Myles *et al.*, 2011). Por otro lado, en estudios con caña de azúcar (*Saccharum* spp.) se han reportado rangos de LD de aproximadamente 10 cM, lo que es considerado un rango amplio (Jannik *et al.*, 2001). Considerando el valor estimado de 4 cM obtenido para la especie, sería un nivel relativamente bajo de LD, el cual es similar a lo reportado en durazno (Li *et al.*, 2013) y en cerezo (Arunyawat *et al.*, 2012), siendo apropiado para aproximaciones de asociación de alta resolución. De cualquier forma, estos resultados deben ser considerados con cuidado debido a que en algunos estudios el valor umbral de LD donde este no es producto de ligamiento físico es determinado arbitrariamente ($r^2 \geq 0,1$) mientras que en este estudio fue calculado ($r^2 \geq 0,24$), por lo que los valores no son directamente comparables, ya que con un $r^2 \geq 0,1$ el rango de LD sería de aproximadamente 8 cM.

En especies cultivadas por su fruto en general se prefiere el mapeo asociativo para identificar genes y marcadores de interés (Khan y Korban, 2012). En este aspecto, el tamaño del genoma y los patrones de LD son críticos para determinar el número de marcadores para revisiones en el genoma completo y la viabilidad económica de los estudios de mapeo asociativo (Myles *et al.*, 2009). Considerando la información existente para en el género *Fragaria*, como la secuencia de genoma completo de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) y el mapa de ligamiento de *F. ×ananassa* (Sargent *et al.*, 2012), es posible aseverar que tanto el mapeo asociativo como el mapeo de QTL son alternativas viables para *F. chiloensis*, con el mapeo asociativo siendo una opción más efectiva considerando la resolución y el poder de detección de QTL que puede entregar una determinada densidad de marcadores (Myles *et al.*, 2009; Würschum *et al.*, 2013).



VII. CONCLUSIÓN

Los resultados del estudio reflejaron que no todos los marcadores exitosamente transferidos a *Fragaria chiloensis*, son compatibles con la metodología de PCR multiplex-ready. Esto es revelado por la falta de amplificación del partidador general con fluoróforo lo que impide su análisis. Además, se determinó que el marcador COBRA es poco informativo ya que se mantiene monomórfico entre todas las accesiones. Sin embargo, los otros 37 marcadores son recomendables para futuros estudios.

La diversidad genética de la especie está dentro del promedio de las especies con similares ciclos de vida, aunque es menor a lo descrito en estudios anteriores en la especie. La diferenciación genética fue baja entre los grupos genéticos determinados por el estudio, lo cual corrobora los resultados obtenidos en otros estudios sobre la estructura poblacional de la especie. Estos grupos genéticos se encuentran distribuidos en sitios que fueron potenciales refugios durante la glaciación y dan cuenta de los procesos ecológicos que vivieron las especies en ese hábitat.

Los resultados de este estudio entregan una primera aproximación al grado de desequilibrio de ligamiento que existe entre loci en *F. chiloensis*, el cual es moderado entre especies silvestres con los mismos hábitos reproductivos. Estos sugieren que un mapeo asociativo en la especie podría poseer una alta resolución.

En base a la distribución de la diversidad genética encontrada, estudios futuros deberían enfocarse en las zonas que se encontraron más diferenciadas dentro de la distribución de la especie, y comparar las diferencias genéticas entre las distintas formas botánicas con un número representativo de muestras para cada una de éstas. Además, debido a la alta resolución que puede entregar el mapeo asociativo en la especie, se recomienda su utilización en la identificación de marcadores asociados a características de interés agronómico, que pudiesen ser igualmente introgresados a programas de mejoramiento de la frutilla comercial.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmadi, H., R.S. Bringham and V. Voth. 1990. Modes of inheritance of photoperiodism in *Fragaria*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115(1): 146-152.
2. Antao, T., A. Lopes, R.J. Lopes, A. Beja-Pereira and G. Luikart. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. *BMC Bioinformatics* 9: 323 DOI: 10.1186/1471-2105-9-323
3. Aranza, M.J., E.-K. Abbassi, W. Howad and P. Arús. 2010. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics* 11: 69 DOI: 10.1186/1471-2156-11-69
4. Arunyawat, U., G. Capdeville, V. Decroocq and S. Mariette. 2012. Linkage disequilibrium in French wild cherry germplasm and worldwide sweet cherry germplasm. *Tree Genetics & Genomics* 8: 699-711.
5. Ashley, M.V., J.A. Wilk, S.M.N. Styan, K.J. Craft, K.L. Jones, K.A. Feldheim, K.S. Lewers, and T.L. Ashman. 2003. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1201-1207.
6. Barnaud, A., V. Lacou, P. This, T. Lacombe and A. Doligez. 2010. Linkage disequilibrium in wild French grapevine, *Vitis vinifera* L. subsp. *silvestris*. *Heredity* 104(5): 431-437.
7. Bassil N.V., M. Gunn, K. Folta and K. Lewers. 2006. Microsatellite markers for *Fragaria* from “Straberry Festival” expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes* 6(2006): 473-476.

8. Bassil, N.V., T.M. Davis, H. Zhang, S. Ficklin, M. Mittmann, T. Webster, L. Mahoney, D. Wood, E.S. Alperin, U.R. Rosyara, H. Koehorst-Vanc Putten, A. Monfort, D.J. Sargent, I. Amaya, B. Denoyes, L. Bianco, T. van Dijk, A. Pirani, A. Iezzoni, D. Main, C. Peace, Y. Yang, V. Whitaker, S. Verma, L. Bellon, F. Brew, R. Herrera and E. van de Weg. 2015. Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria ×ananassa*. BMC Genomics 16:155 doi: 10.1186/s12864-015-1310-1
9. Becerra, V.V., M.C. Paredes, A.O. Romero and A.A. Lavín. 2001. Biochemical and molecular diversity in Chilean strawberries (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) and its implication for genetic improvement of the species. Agricultura Técnica 61(4):413-428.
10. Becerra, V., M. Paredes, C. González and A. Lavín. 2002. Caracterización molecular de 62 posibles progenitores de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. Para un programa de mejoramiento. AgroCiencia 17: 145-152.
11. Becerra V., M. Paredes and A. Lavín. 2005. Biochemical and molecular diversity in the Chilean strawberry and its implications for plant breeding. HortScience 40(6): 1642-1643.
12. Blacket, M.J., C. Robin, R.T. Good, S.F. Lee and A.D. Miller. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments – an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. Molecular Ecology Resources 12(3): 456-463.
13. Bradbury P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss and E.S. Buckler. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23:2633-2635.
14. Breseghello, F. and M.E. Sorrells. 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Genetics 172: 1165–1177.

15. Bringhurst, R.S. and T. Gill. 1970. Origin of *Fragaria* polyploids. II. Unreduced and doubled-unreduced gametes. *American Journal of Botany* 57(8): 969-976.
16. Brown, A.H.D. and J. Munday. 1982. Population-genetic structure and optimal sampling of land races of barley from Iran. *Genetica* 58: 85-96.
17. Brunings, A.M., C. Moyer, N. Peres and K.M. Folta. 2010. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. *Euphytica* 173 (2010): 63-75.
18. Cao, K., L. Wang, G. Zhu, W. Fang, C. Chen and J. Luo. 2012. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and association mapping analyses of peach (*Prunus persica*) landraces in China. *Tree Genetics & Genomics* 8: 975-990.
19. Carrasco, B., M. Garcés, P. Rojas, G. Saud, R. Herrera, J.B. Retamales and P.D.S. Caligari. 2007. The Chilean strawberry [*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.]: genetic diversity and structure. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132 (4): 501-506.
20. Catalán, P., J.G. Serraga-Moragues, M. Palop-Esteban, C. Moreno and F. González-Candelas. 2005. A bayesian approach for discriminating among alternative inheritance hypotheses in plant polyploids: The allotetraploid origin of genus *Borderea* (Dioscoreaceae). *Genetics* 172 (3): 1939-1953.
21. Cekic, C., N.H. Battey and M.J. Wilkinson. 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 540-546.
22. Charlesworth, D., B. Charlesworth, and C. Strobeck. 1977. Effects of selfing on selection for recombination. *Genetics* 86: 213–226.

23. Cherian, S., C.R. Figueroa and H. Nair. 2014. 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany* 65(17):4705-4722.
24. Cipriani, G. and R. Testolin. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*. *Molecular Ecology Notes* 4: 366-368.
25. Clark, L.V. and M. Jasieniuk. 2011. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11: 562–566.
26. Concha, C.M., N.E. Figueroa, L.A. Poblete, F.A. Oñate, W. Schwab and C.R. Figueroa. 2013. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 433-444.
27. Congiu, L., M. Chicca, R. Cella, R. Rossi and G. Bernacchia. 2000. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology* 9(2): 229–232.
28. Coyne, J.A. and H.A. Orr. 2004. *Speciation* (Vol. 37). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
29. Darrow, G. M. 1966. *The Strawberry; History, Breeding, and Physiology* (1st ed.). Holt, Rinehart and Winston.
30. Davis, T.M. and H.Yu. 1997. A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Journal of Heredity* 88:215-221.
31. Demeke, T. and R. G. Ronald Jenkins. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 1977-1990.

32. Degani, C., L.J. Rowland, J.A. Saunders, S.C. Hokanson, E.L. Ogden, A. Golan-Goldhirsh and G.J. Galletta. 2001. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria ×ananassa* Duch.) Based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica* 117:1-12.
33. Dirlewanger, E., P. Cosson, M. Tavaud, J. Aranza, C. Poizat, A. Zanetto, P. Arús and F. Laigret. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105(1): 127–138.
34. Dirlewanger, E., B. Denoyes-Rothan, T. Yamamoto and D. Chagné. 2009. 26. Genomics tools across Rosaceae species. En *Genetics and Genomics of Rosaceae*. K.M. Folta y S. E. Gardiner (eds). Editorial Springer.
35. Durham, S. 2013. New strawberry species found in Oregon. *Agricultural research* 61 (6): 13: <http://digitalcommons.unl.edu/usdaagresmag/68/>.
36. Earl, D.A. and B.M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361.
37. Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611-2620.
38. Excoffier, L., P.E. Smouse. and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131 (2): 479-491.
39. Excoffier, L., T. Hofer and M. Foll. 2009. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* 103:285-298.

40. Falush, D., M. Stephens, J.K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Resources* 7 (4):574-578.
41. FIA (Fundación para la Innovación Agraria). 2002. Estrategia de innovación agraria para la producción de berries. Ministerio de Agricultura, Santiago de Chile, Octubre de 2002.
42. Figueroa, C.R., P. Pimentel, C. Gaete-Eastman, M. Moya, R. Herrera, P.D.S. Caligari and M.A. Moya-León. 2008. Softening rate of the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit reflects the expression of polygalacturonase and pectate lyase genes. *Postharvest Biology and Technology* 49: 210-220.
43. Figueroa, C.R., H.G Rosli, P.M. Civello, G.A. Martínez., R. Herrera and M.A. Moya-León. 2010. Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria ×ananassa* fruits. *Scientia Horticulturae* 124: 454-462.
44. Figueroa, C.R., M.C. Opazo, P. Vera, O. Arriagada, M. Díaz and M.A. Moya-León. 2012. Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell Wall composition and expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit. 132(4): 2014-2022.
45. Finn, C.E., J.B. Retamales, G.A. Lobos and J.F. Hancock. 2013. The Chilean Strawberry (*Fragaria chiloensis*): Over 1000 Years of Domestication. *HortScience* 48(4): 418–421.
46. Flint-Garcia, S.A., J.M. Thornsberry and E.S. Bluckler IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54:357-374.
47. Folta, K.M. and T.M. Davis. 2006. Strawberry genes and Genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 399-415.

48. Gil-Ariza, D.J., I. Amaya, M.A. Botella, J. Muñoz-Blanco, J.L. Caballero, J.M. López-Aranda, V. Valpuesta and J.F. Sánchez-Sevilla. 2006. EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria ×ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes* 6:1195-1197.
49. Goldstein, D.B. and D.D. Pollock. 1997. Launching microsatellites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. *Journal of Heredity* 88(5): 335-342.
50. González, M., C. Gaete-Eastman, M. Valdenegro, C. R. Figueroa, L. Fuentes, R. Herrera and M. A. Moya-León. 2009. Aroma development during ripening of *Fragaria chiloensis* fruit and participation of an alcohol acyltransferase (FcAAT1) gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9123-9132.
51. Govan, C.L., D.W. Simpson, A.W. Johnson, K.R. Tobutt and D.J. Sargent. 2008. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. ×ananassa* cultivars. *Molecular Breeding* 22: 649-661.
52. Hadonou, A.M., D.J. Sargent, F. Wilson, C.M. James and D.W. Simpson. 2004. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. *Genome* 47: 429-438.
53. Hancock, J.F. and R.S. Bringhurst. 1979. Hermaphroditism in predominately dioecious populations of *Fragaria chiloensis* (L.) Duchn. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 106(3): 229-231.
54. Hancock, J.F. and R.S. Bringhurst. 1980. Sexual dimorphism in the strawberry *Fragaria chiloensis*. *Evolution* 34(4): 762-768.
55. Hancock, J., J. Luby and A. Dale. 1993. Should we reconstitute the strawberry?. *Acta Horticulturae* 348: 86-93.

56. Hancock, J., A. Lavín and J.B. Lavín. 1999. Our southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. HortScience 34 (5): 814-816.
57. Hancock, J.F., C.E. Finn, J.J. Luby, A. Dale, P.W. Callow and S. Serçe. 2010. Reconstruction of the strawberry, *Fragaria ×ananassa*, using genotypes of *F. virginiana* and *F. chiloensis*. HortScience 45(7): 1006-1013.
58. Hao, C., L. Wang, H. Ge, Y. Dong and X. Zhang. 2011. Genetic diversity and linkage disequilibrium in chinese bread wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers. PLoS one 6(2): e17279.
59. Hayden, M.J., T.M. Nguyen, A. Waterman and K.J. Chalmers. 2008a. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. BMC Genomics 9(80).
60. Hayden, M.J., T.M. Nguyen, A. Waterman, G.L. McMichael and K.J. Chalmers. 2008b. Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. Molecular Breeding 21: 271-281.
61. Helsen, P., P. Verdyck, A. Tye and S. Van Dongen. 2009. Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galapagos). Plant Systematics and Evolution 279:1–10.
62. Hill, B.J. and A. Robertson. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. Theoretical and Applied Genetics 38: 226-231.
63. Hirakawa, H., K. Shirasawa, S. Kosugi, K. Tashiro, S. Nakayama, M. Yamada, M. Kohara, A. Watanabe, Y. Kishida, T. Fujishiro, H. Tsuruoka, C. Minami, S. Sasamoto, M. Kato, K. Nanri, A. Komaki, T. Yanagi, Q. Guoxin, F. Maeda, M. Ishikawa, S. Kuhara, S. Sato, S. Tabata and S.N. Isobe. 2014. Dissection of the octoploide strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* Species. DNA Research 21: 169-181.

64. Holsinger, K.E. and B.S. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *EEB Articles Paper 22*. http://digitalcommons.uconn.edu/eeb_articles/22
65. Holton, T.A. 2001. Chapter 2: Plant genotyping by analysis of microsatellites. In: *Plant genotyping: The DNA fingerprinting of plants*. Henry, R.J. (ed). CABI Publishing, New York, USA. Pp. 15-28.
66. Hubisz, M.J., D. Falush, M. Stephens and J.K. Pritchard. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. 2009. *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1322-1332.
67. Hummer, K.E., P. Nathewet and T. Yanagi. 2009. Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 96(3): 713-716.
68. Khan, M.A. and S.S. Korban. 2012. Association mapping in forest trees and fruit crops. *Journal of Experimental Botany* 63: 4045-4060.
69. Laidò, G., D. Marone, M.A. Russo, S.A. Colecchia, A.M. Mastrangelo, P. De Vita and R. Papa. 2014. Linkage disequilibrium and genome-wide association mapping in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) *PLoS ONE* 9(4): e95211.
70. Lam, H., X. Xu, X. Liu, W. Chen, G. Yang, F. Wong, M. Li, W. He, N. Qin, B. Wang, J. Li, M. Jian, J. Wang, G. Shao, J. Wang, S.S. Sun and G. Zhang. 2010. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature Genetics* 42: 1053-159.
71. Lavín, A., A. del Pozo and M. Maureira. 2000. Distribución actual de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. en Chile. *Plant Genetic Resources Newsletter* 122: 24-28.
72. Lavín, A. and M. Maureira. 2002. La frutilla chilena de fruto blanco. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 39. Cauquenes, Chile.

73. Lerceteau-Köhler, E., G. Guerin, F. Laigret and B. Denoyes-Rothan. 2003. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploide strawberry (*Fragaria ×ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 107:619-628.
74. Lewers, K.S., S.M.N. Styán, S.C. Hokanson and N.V. Bassil. 2005. Strawberry GenBank-derived and genomic Simple Sequence Repeat (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130 (1): 102–115.
75. Li, L., C. Wanapu, X. Huang, T. Huang, Q. Li, Y. Peng and G. Huang. 2011. Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of *Brassica napus* hybrids. *Journal of Agricultural Science* 3(3): 101-110.
76. Li, J., M.H. Koski and T.-L. Ashman. 2012. Functional characterization of gynodioecy in *Fragaria vesca* ssp. *bracteata* (Rosaceae). *Annals of Botany* 109: 545-552
77. Li, X., X. Meng, H. Jia, M. Yu, R. Ma, L. Wang, K. Cao, Z. Shen, L. Niu, J. Tian, M. Chen, M. Xie, P. Arus, Z. Gao and M.J. Aranza. 2013. Peach genetic resources: diversity, population structure and linkage disequilibrium, *BMC Genetics* 2013 14:84 doi: 10.1186/1471-2156-14-84
78. Liu, A. and J.M. Burke. 2006. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics* 173: 321-330.
79. Longhi, S., L. Giongo, M. Buti, N. Surbanovski, R. Viola, R. Velasco, J.A. Ward and D.J. Sargent. 2014. Molecular genetics and genomics of the Rosoidae: state of the art and future perspectives. *Horticulture research* 1: 1;doi:10.1038/hortres.2014.1
80. Luo, Z.W., C.A. Hackett, J.E. Bradshaw, J.W. McNicol and D. Milbourne. 2001. Construction of a genetic linkage map in tetraploid species using molecular markers. *Genetics* 157: 1369-1385.

81. Malysheva-Otto, L.V., M.W. Ganal and M.S. Röder. 2006. Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germoplasm (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genetics* 7:6 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/7/6>
82. Markwith, S.H., D.J. Stewart and J.L. Dyer. 2006. TETRASAT: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 6:586–589.
83. McGrath, C.L. and M. Lynch. 2012. Evolutionary significance of whole-genome duplication. En: *Polyploidy and Genome Evolution*. Editorial Springer Berlin Heidelberg. Pp 1-20.
84. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43:1235-1248.
85. Monfort, A., S. Vilanova, T.M. Davis and P. Arús. 2006. A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria ×ananassa*. *Molecular Ecology Notes* 6: 197-200.
86. Mora, F., C.M. Concha and C.R. Figueroa. 2016. Bayesian inference of genetic parameters for survival, flowering, fruit set, and ripening in a germplasm collection of Chilean strawberry using threshold models. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 141(3): 285-291.
87. Morrell, P.L., D.M. Toleno, K.E. Lundy and M.T. Clegg. 2005. Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2442-2447.

88. Myles, S., J. Peiffer, P.J. Brown, E.S. Ersoz, Z. Zhang, D.E. Costich and E.S. Buckler. 2009. Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell* 21(8): 2194-2202.
89. Myles, S., A.R. Boyko, C.L. Owens, P.J. Brown, F. Grassi, M.K. Aradhya, B. Prins, A. Reynolds, J.-M. Chia, D. Ware, C.D. Bustamante and E.S. Buckler. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(9): 3457-3458.
90. Nishizawa, T., S. Nagasawa, J.B. Retamales, A. Lavín and Y. Motomura. 2002. Comparison of cell wall components between *Fragaria* × *ananassa* and *Fragaria chiloensis* grown in Chile. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 404-410.
91. Nordborg, M., J.O. Borevitz, J. Bergelson, C.C. Berry, J. Chory, J. Hagenblad, M. Kreitman, J.N. Maloof, T. Noyes, P.J. Oefner, E.A. Stahl and D. Weigel. 2002. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 30(2): 190-193.
92. Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
93. Oñate, F. 2014. Análisis de transferibilidad de marcadores moleculares SSR (Simple Sequence Repeats) desde *Fragaria* × *ananassa* a *Fragaria chiloensis*. Memoria para optar al título de ingeniero en biotecnología vegetal. Universidad de Concepción.
94. Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
95. Peakal, R. and P.E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

96. Pérez-Collazos, E. and P. Catalán. 2006. Palaeopolyploidy, spatial structure and conservation genetics of the narrow steppe plant *Vella pseudocytisus* subsp. *pau* (Vellinae, Cruciferae). *Annals of Botany* 97: 635-647.
97. Perlin, M.W., G. Lancia and S.-K. Ng. 1995. Towards fully automated genotyping: genotyping microsatellite markers by deconvolution. *American Journal of Human Genetics* 57: 1199-1210.
98. Pfeifer, T., A.M. Roschanski, J.R. Pannell, G. Korbecka and M. Schnittler. 2011. Characterization of microsatellite loci and reliable genotyping in a polyploidy plant, *Mercurialis perennis* (Euphorbiaceae). *Journal of Heredity* 102(4): 479-488.
99. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
100. Pruett, C.L. and K. Winker. 2008. The effects of sample size on population genetic diversity estimates in songs sparrows *Melospiza melodia*. *Journal of Avian Biology* 39: 252-256.
101. Raboin, L.M., J. Pauquet, M. Butterfield, A. D'Hont and J.C. Glaszmann. 2008. Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 701-714.
102. Retamales, J.B., P.D.S. Caligari, B. Carrasco and G. Saud. 2005. Current status of the Chilean native strawberry (*Fragaria chiloensis* L. (Duch.)) and the research needs to convert the species into a commercial crop. *HortScience* 40: 1633-1634.
103. Ronfort, J.L., E. Jenczewski, T. Bataillon and F. Rousset. 1998. Analysis of population structure in autotetraploid species. *Genetics* 150: 921-930.

104. Rousseau-Gueutin M., E. Lerceteau-Köhler, L. Barrot, D.J. Sargent, A. Monfort, D. Simpson, P. Arús, G. Guérin and B. Denoyes-Rothan. 2008. Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* 179: 2045-2060.
105. Rousseau-Gueutin, M., A. Gaston, A. Aïnouche, M.L. Aïnouche, K. Olbricht, G. Staudt, L. Richard and B. Denoyes-Rothan. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51(3): 515–530.
106. Salvatierra, A., P. Pimentel, M.A. Moya-Leon and R. Herrera. 2011. Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of *FcMYB1* gene. *Phytochemistry* 90: 25-36.
107. Sapra R.L., P. Narain and S.V.S. Chauhan. 1998. A general model for sample size determination for collecting germ-plasm. *Journal of Biosciences*. 23: 647–652.
108. Sargent, D.J., J. Clarke, D.W. Simpson, K.R. Tobutt, P. Arús, A. Monfort., S. Vilanova, B. Denoyes-Rothan, M. Rousseau, K.M. Folta, N.V. Bassil and N.H. Battey. 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1349–1359.
109. Sargent, D.J., G. Cipriani, S. Vilanova, D. Gil-Ariza, P. Arús, D.W. Simpson, K.R. Tobutt and A. Monfort. 2008. The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* 51: 120-127.
110. Sargent, D.J. 2009a. Strawberry (*Fragaria* spp.) Structural Genomics. En: *Plant Genetic/Genomics Volume 6: Genetics and Genomics of Rosaceae*. K.M. Folta, S.E. Gardiner (eds.). Springer. Pp. 437-456.

111. Sargent, D.J., F. Fernández-Fernández, J.J. Ruiz-Roja, B.G. Sutherland, A. Passey, A.B. Whitehouse and D.W. Simpson. 2009b. A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria ×ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Molecular Breeding* 24: 293-303.
112. Sargent, D.J., P. Kuchta, E. Lopez-Girona, H. Zhang, T.M. Davis, J. Celton, A. Marchese, M. Korbin, K.M. Folta, V. Shulaev and D.W. Simpson. 2011. Simple sequence repeat marker development and mapping targeted to previously unmapped regions of the strawberry genome sequence. *The Plant Genome* 4: 165-177.
113. Sargent, D.J., T. Passey, N. Surbanovski, E. Lopez Girona, P. Kuchta, J. Davik, R. Harrison, A. Passey, A.B. Whitehouse and D.W. Simpson. 2012. A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria ×ananassa*) suggest extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 1229–1240.
114. Saud, G., F. Carbone, G. Perrota, C. Figueroa, M. Moya, R. Herrera, J.B. Retamales, B. Carrasco, J. Cheel, G. Schmeda-Hirschmann and P.D.S Caligari. 2009. Transcript profiling suggest transcriptional repression of the flavonoid pathway in the white fruited Chilean native strawberry, *F. chiloensis*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 895-903.
115. Sérsic, A.N., A. Cosacov, A.A. Cocucci, L.A. Johnson, R. Pozner, L.J. Avila, J.W. Sites Jr. and M. Morando. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103(2): 475-494.

116. Shulaev, V., D.J. Sargent, R.N. Crowhurst, T.C. Mockler, O. Folkerts, A.L. Delcher, P. Jaiswal, K. Mockaitis, A. Liston, S.P. Mane, P. Burns, T.M. Davis, J.P. Slovin, N. Bassil, R.P. Hellens, C. Evans, T. Harkins, C. Kodira, B. Desany, O.R. Crasta, R.V. Jensen, A.C. Allan, T.P. Michael, J.C. Setubal, J.M. Celton, D.J. Rees, K.P. Williams, S.H. Holt, J.J. Ruiz-Rojas, M. Chatterjee, B. Liu, H. Silva, L. Meisel, A. Adato, S.A. Filichkin, M. Troggio, R. Viola, T.L. Ashman, H. Wang, P. Dharmawardhana, J. Elser, R. Raja, H.D. Priest, D.W. Bryant Jr, S.E. Fox, S.A. Givan, L.J. Wilhelm, S. Naithani, A. Christoffels, D.Y. Salama, J. Carter, E. Lopez-Girona, A. Zdepski, W. Wang, R.A. Kerstetter, W. Schwab, S.S. Korban, J. Davik, A. Monfort, B. Denoyes-Rothan, P. Arus, R. Mittler, B. Flinn, A. Aharoni, J.L. Bennetzen, S.L. Salzberg, A.W. Dickerman, R. Velasco, M. Borodovsky, R.E. Veilleux and K.M Folta. 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature genetics* 43: 109-116.
117. Smari, H. 2015. A biogeographic analysis of the species *Fragaria vesca* using microsatellite markers on a worldwide plant collection. Msc. Thesis. Agricultural University of Iceland. <http://skemman.is/handle/1946/23439>
118. Sorkeh, K., L.V. Malysheva-Otto, M.G. Wirthensohn, S. Tarkesh-Esfahani and P. Martínez-Gómez. 2008. Linkage disequilibrium, genetic association mapping and gene localization in crop plants. *Genetics and Molecular Biology* 31(4): 805-814.
119. Spigler, R.B., K.S. Lewers, D.S. Main and T-L. Ashman. 2008. Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome. *Heredity* 101: 507–517.
120. Staudt, G. 1962. Taxonomic studies in the genus *Fragaria*: Typification of species known at the time of Linnaeus. *Canadian Journal of Botany* 40: 869-886.
121. Staudt, G. 1967. Die Genetik und Evolution der Heterozie in der Gattung III. Untersuchungen an hexa-und oktoploiden Arten. *Z. Pflanzenzuchtg* 59: 83-102.

122. Staudt, G. 1989. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horticulturae* 265: 23-33.
123. Stegmeir, T.L., C.E. Finn, R.M. Warner and J.F. Hancock. 2010. Performance of an Elite Strawberry Population Derived from Wild Germplasm of *Fragaria chiloensis* and *F. virginiana*. *HortScience* 45(8): 1140–1145.
124. Würschum, T., S.M. Langer, C.F.H. Longin, V. Korzun, E. Akhunov, E. Ebmeyer, R. Schachschneider, J. Schacht, E. Kazman and J.C. Reif. 2013. Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 1477-1486.
125. Yan, J., T. Shah, M.L. Warburton, E.S. Buckler, M.D. McMullen and J. Crouch. 2009. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS One* 4:e8451.
126. Yoon, M., K.T. Moe, D. Kim, I. Rho, S. Kim, K. Kim, M. Won, J. Chung and Y. Park. 2012. Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria ×ananassa* Duch.) using SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 15(2): DOI: 10.2225/vol15-issue2-fulltext-5.
127. Zamir, D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews – Genetics* 2: 983-989.
128. Zorrilla-Fontanesi, Y., A. Cabeza, P. Domínguez, J.J. Medina, V. Valpuesta, B. Denoyes-Rothan, J.F. Sánchez-Sevilla and I. Amaya. 2011a. Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria ×ananassa*). *Theoretical and Applied Genetics* 123: 755-778.

129. Zorrilla-Fontanesi, Y., A. Cabeza, A.M. Torres, M.A. Botella, V. Valpuesta, A. Monfort, J.F. Sánchez-Sevilla and I. Amaya. 2011b. Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid and their transferability across the Rosoideae subfamily. *Molecular Breeding* 27: 137-156.



IX. APÉNDICE

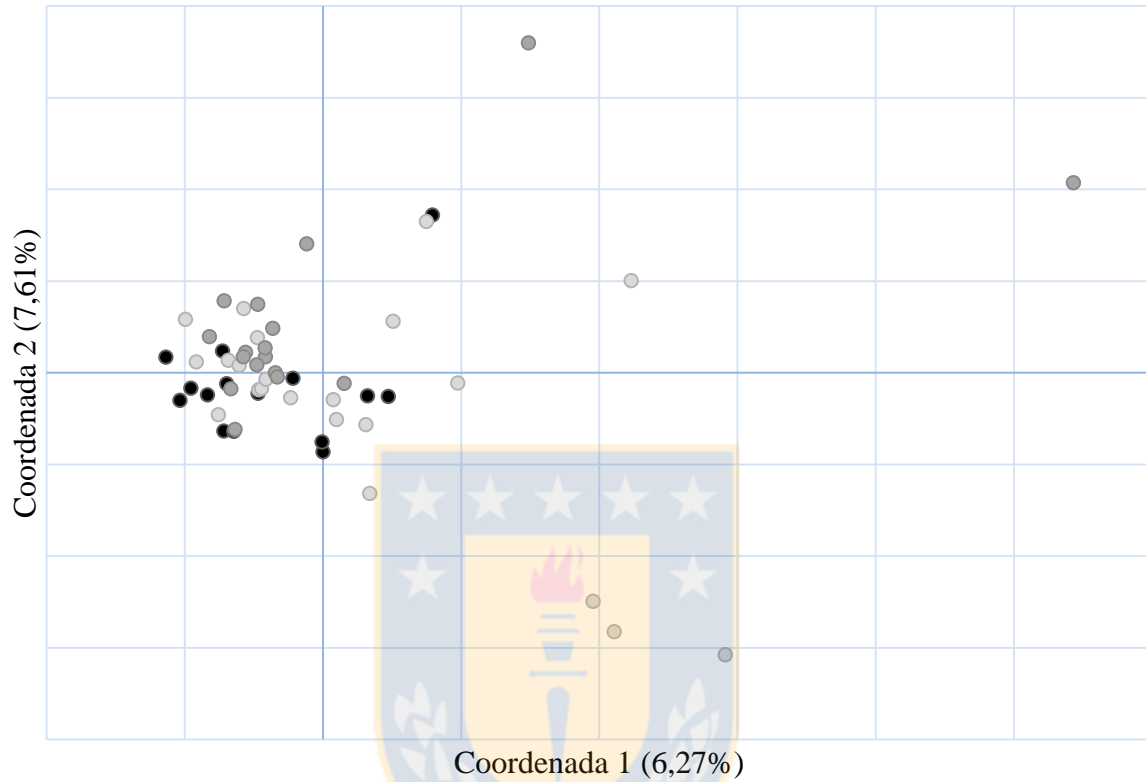


Figura 1-A. Gráfico de dispersión que muestra los dos principales ejes del análisis de coordenadas principales (PCoA) de todas las accesiones de *F. chilensis* basado en los datos de los microsátelites. Fuente: Elaboración propia.