

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal**



**CARACTERIZACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA Y CONTENIDO DE ADN DE DISTINTAS
ACCESIONES DE *FRAGARIA CHILOENSIS* (L.) MILL.**

**MEMORIA DE TÍTULO PRESENTADA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

MANUEL ALEJANDRO QUILODRÁN GUTIÉRREZ

LOS ÁNGELES – CHILE

2015

CARACTERIZACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA Y CONTENIDO DE ADN DE DISTINTAS ACCESIONES DE *FRAGARIA CHILOENSIS* (L.) MILL.

Alumno

**Manuel Alejandro Quilodrán
Gutiérrez**

**Ingeniero en Biotecnología
Vegetal**

Profesor Guía

Dr. Carlos Figueroa Lamas

Profesor Asociado

Ingeniero Agrónomo

Jefe de Carrera

Dr. Guillermo Pereira Cancino

Profesor Asociado

Ingeniero Forestal

Director Departamento

M. Sc. Pablo Novoa Barra

Profesor Asistente

Ingeniero en Ejecución Forestal

“When you walk through a storm,

Hold your head up high,

And don't be afraid of the dark.

At the end of a storm,

There's a golden sky,

And the sweet silver song of a lark ...”

(You'll never walk alone, Himno del Liverpool F. C)

Dedicada a la memoria de mis abuelas y abuelos,

Ya que a pesar de las pocas probabilidades

de conocerse, dieron vida a mis padres.

Agradecimientos.

Quiero partir agradeciendo a todos los trabajadores que directa o indirectamente me permitieron tener esta oportunidad de desarrollarme como persona y como profesional.

Dicho esto agradezco a mis padres, por su cariño y sus enseñanzas, a mi viejo por hacerme entender que no es tan malo pensar distinto a los demás y además a criticar el pensamiento de los demás, se menos mañoso pero no cambies nunca. A mi mamá le agradezco su inmenso amor y su sentido del humor tan particular. A mis hermanos por los buenos momentos vividos y las carcajadas sacadas más de alguna vez con cada tontera. A mi hijo, Emilito por ayudarme a no rendirme y darme fuerzas para seguir aunque estuviera vencido y sus sonrisas, a su madre Claudia por las correcciones.

Quiero agradecer particularmente a mi primo Francisco Fuentes, que en su Figura de hermano mayor, me ha enseñado lecciones que no he aprendido en ningún lado y hacerme ver que después de la tormenta siempre sale el sol.

Agradezco también a mis amigos, Claudio, que a pesar de los años la amistad se mantiene, a Gabriel Bravo y Oscar Arrey por su amistad incondicional, a Pilmaiken, por su buena onda y al team cine club: Pauly, Natalia, Belén y Sole, aunque no hablemos a menudo agradezco su amistad profundamente.

Agradezco la buena voluntad y hospitalidad de Don Francisco Maldonado y La tía Sandra Chávez, gracias por recibirme en su hogar y al vecino Enrique por su buena voluntad a la hora de llevarme a la universidad.

Agradezco al profesor Cristian Atala, por actuar como guía en el mundo científico, al profesor Carlos Figueroa por aceptarme y darme la oportunidad de realizar mi tesis bajo su tutoría y a la Dra. Viviana Torres junto con Carla Vejar por su tiempo y ayudarme con la técnica de citometría de flujo en plantas

Agradezco también a los Dr. David Galbraith, Dr. Spencer Brown, Dr. Jaroslav Dolezel y Dra. Ma. Silvina Soto por su importante ayuda técnica en este trabajo.

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto Anillo ACT-1110, del programa de investigación asociativa de CONICYT

Índice de contenidos.

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
CARACTERIZACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA Y CONTENIDO DE ADN DE DISTINTAS ACCESIONES DE <i>FRAGARIA CHILOENSIS</i> (L.) MILL.	I
Índice de contenidos.....	IV
Índice de tablas	VI
Índice de figuras.	VI
Nomenclatura y abreviaciones.	VII
I. Resumen.....	1
II. Abstract.	2
III. Introducción.....	3
IV. Marco teórico.	6
4.1 La Frutilla chilena.	6
4.2 La citometría de flujo como herramienta de estudio de los genomas vegetales.	7
4.3 La citometría de flujo aplicada al estudio de frutillas.	11
V. Hipótesis.	12
VI. Objetivos.	12
6.1 Objetivo general.	12
6.2 Objetivos específicos.....	12
VII. Metodología.....	13
7.1 Material vegetal.	13
7.2 Elección del buffer de extracción de núcleos.	13
7.3 Análisis citológicos.	15
7.4 Análisis estadístico.....	16
VIII. Resultados	17
8.1 Elección del buffer de extracción de núcleos.	17
8.2 Determinación del nivel de ploidía y contenido de ADN.	19
IX. Discusión.....	23
9.1 Aplicación del buffer en estudio.....	23
9.2 Uso de <i>Hordeum vulgare</i> como control.	24
9.3 Variaciones en nivel del genoma.....	25

9.4 Presencia de una posible <i>Fragaria vesca</i> en Chile.	26
X. Conclusiones.....	27
XI. Referencias.....	28
XII. Anexo	36
XIII. Apéndice	43

Índice de tablas

<u>Tabla N°</u>	<u>Página</u>
En el texto.	
1. Especies del género <i>Fragaria</i> , nivel de ploidía y ubicación.....	.5
2. Nombre, composición química y referencia de buffers.....	14
3. Nivel de ploidía de distintas accesiones de <i>Fragaria chiloensis</i>	20
4. Contenido de ADN de distintas accesiones de <i>Fragaria chiloensis</i>	21

Índice de figuras.

<u>Figura N°</u>	<u>Página</u>
En el texto.	
1. Esquema de un citómetro de flujo.....	5
2. Dispersión de <i>Fragaria chiloensis</i> por el mundo.....	7
3. Gráficos de resultados post-análisis de buffers en <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
4. Gráficos de resultados post-análisis de buffers en <i>Fragaria chiloensis</i>	18
5. Imagen de posible <i>Fragaria vesca</i>	19
6. Gráficos de resultados post-análisis de citometría de <i>Hordeum vulgare</i>	22
con distintas especies del género <i>Fragaria</i>	

Nomenclatura y abreviaciones.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

°C: Grados Celsius

CFP: citometría de flujo en plantas.

cv: cultivar.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindo.

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etildiaminotetraacético.

F: Fragaria

f: forma

FSC: detector frontal.

h: horas

HCl: ácido Clorhídrico

HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil]- etanosulfónico.

PI: yoduro de propidio.

PE: canal detector de yoduro de propidio.

KCl: cloruro de potasio.

mg: miligramos.

MgCl₂: cloruro de magnesio

MgSO₄·7H₂O: sulfato de magnesio heptahidratado

MgCl₂·6H₂O: cloruro de magnesio hexahidratado.

min: minutos

mM: mili molar.

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

nm: nano metros.

pg: pico gramos

PercP-Cy5.5: canal detector de PercP-Cy5.5

PVP: polivinilpirrolidona.

SSC: detector lateral

Subsp. : subespecie.

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

I. Resumen.

La frutilla chilena (*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.) se caracteriza por ser una planta octoploide ($2n = 8x = 56$), se ha cultivado desde hace más de 1.000 años por los aborígenes de Chile, siendo una fuente importante de recursos genéticos y características agronómicas.

Este estudio busca determinar el nivel de ploidía y contenido de ADN por citometría de flujo en diferentes accesiones de *F. chiloensis*, recolectadas desde la región del Maule hasta la región de Aysén, pertenecientes al banco de germoplasma situados en la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción. La citometría de flujo permite determinar el tamaño, la rugosidad, además el nivel de ploidía y contenido de ADN del núcleo. Para determinar el nivel de ploidía se usó *Fragaria x anannassa* Duch. cv. Aromas como control octoploide y *Fragaria vesca* L. var. Hawaii, como modelo diploide. Para determinar el contenido de ADN, se utilizó *Hordeum vulgare* L., como especie estándar. Cincuenta y siete accesiones de *F. chiloensis* fueron analizadas utilizando la metodología de Galbraith, usando como fluorocromo ioduro de propidio, también se probó un set de buffers de extracción de núcleos, seleccionándose para la investigación el buffer Bors modificado. Los principales resultados del estudio mostraron que una accesión es diploide en contraste con las otras, octoploides. Esta especie diploide podría tratarse de *Fragaria vesca* naturalizada. Finalmente, la técnica en estudio es la primera, en demostrar, a la fecha, que la caracterización citológica de diferentes accesiones de *Fragaria Chiloensis* con ioduro de propidio como fluorocromo puede ser posible.

Algunos resultados de la presente Memoria de Título han sido publicados en el siguiente artículo científico: Figueroa, C.R., Quilodran, M., Penailillo, P., Baeza, C.M., & Arrey-Salas, O. (2023). A naturalized diploid *Fragaria* sp. (Rosaceae) found in southern Chile as revealed by morphological, ploidy and cytogenetic analyses. *Phytotaxa*, 632(1), 49-59. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.632.1.4>

II. Abstract.

The Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.), is an octoploide plant ($2n = 8x = 56$), which has been cultivated for over 1,000 years ago by the natives of Chile. This species is an important source of genetic resources and agronomic characteristics. This aim of these study is to determine the level of ploidy and DNA content by flow cytometry in different accessions of *F. chiloensis*, collected from the Maule to the Aysen region, belonging to the germplasm bank located at the Faculty of Forest Sciences at the University of Concepción. Flow cytometry technique can determine the size, roughness, also the level of ploidy and nuclear DNA content. To determine the ploidy level was used *Fragaria x anannassa* Duch. cv. Aromas as octoploide control and *Fragaria vesca* L. var. Hawaii, as diploid model. To determine the DNA content, *Hordeum vulgare* L. was used as standard species. Fifty-seven *F. chiloensis* accessions were analyzed using the methodology of Galbraith, using propidium iodide as fluorochrome, a set coring buffers was also tested, selected for investigation Bors modified buffer. The main results of the study showed that an accession is diploid in contrast to the other, octoploid. This diploid species could be a naturalized *F. vesca*. Finally, this technical study is the first, to demonstrate, to date, the cytological characterization of different accessions of *Fragaria Chiloensis* with propidium iodide as fluorochrome may be possible.

III. Introducción

El género *Fragaria* consta de 26 especies, las que se distribuyen de manera silvestre en el hemisferio norte, con la excepción de *Fragaria chiloensis* (L.) Mill., localizada de manera natural en Sudamérica y *Fragaria x ananassa* Duch., cultivada en todo el mundo por el alto valor comercial del fruto (Hancock *et al.*, 1999; Staudt, 2008, Hummer *et al.*, 2011) (Tabla 1). Dentro de los avances en ciencia, el conocimiento de las características atinentes al núcleo de las células vegetales, como el nivel de ploidía y contenido de ADN, se hacen necesarias para la caracterización citológica como paso previo a estudios genéticos más extensos y profundos. El término ploidía hace referencia al número de grupos completos de cromosomas que tiene una célula (Cullis, 2004). Para el género *Fragaria* el número básico es de 7 cromosomas por grupo, tratándose de un género con especies poliploides. La poliploidía se define como el fenómeno por el cual se originan células, tejidos u organismos con tres o más juegos completos de cromosomas: si los genomas de una especie poliploide provienen de la misma especie, se dice que es autopoliploide o autoploide; si provienen de dos especies diferentes se dice que es aloploide o aloploide (Cullis, 2004). Este proceso es frecuente en plantas, encontrándose muy extendida dentro de las angiospermas estando relacionada principalmente con la latitud geográfica (Cullis, 2004). Generalmente, en plantas poliploides se da el fenotipo giga, en cual se produce un aumento de tamaño en los individuos poliploides ya que poseen mayor número de células que los individuos diploides (Cullis, 2004); existiendo en el género especies diploides, tetraploides, hexaploides, octaploides y decaploides (Hummer *et al.*, 2011) (Tabla 1). Se ha documentado que el cruce de las especies con igual o distinto nivel de ploidía dan origen a híbridos, los que pueden mantener o diferir del nivel de ploidía de sus progenitores (Yanagi *et al.*, 2010; Rho *et al.*, 2012) y reproducirse de manera sexual o asexual (Yanagi *et al.*, 2010). Además, el nivel de ploidía del género puede aumentarse de manera artificial al aplicarse técnicas de cultivo de tejidos, como la generación de plantas a partir de callos, obteniéndose de esta manera plantas con eventos de endo-poliploidización. (Nehra *et al.*, 1990; Brandizzi *et al.*, 2000). La endo-poliploidía en plantas se origina principalmente por el proceso de endo-reduplicación, este es el resultado de la capacidad de las células para modificar el ciclo celular de estas, en uno parcial donde la síntesis del ADN se desacopla de la mitosis

(Kondorosi y Kondorosi, 2004; Dante *et al.*, 2014). Durante la endo-reduplicación, la duplicación del ADN nuclear se produce en ausencia de las etapas de condensación y descondensación, produciéndose cromosomas politénicos, estos son cromosomas normales que sufren ciclos de replicación, en los que se copian las cadenas de ADN una y otra vez, sin que al final del proceso ocurra la separación de los cromosomas, citocinesis, ni la división celular (Contreras, 2013), originando núcleos con múltiples niveles de ploidía (tetraploides, hexaploides, octaploides ...) sin presentar cambios en el número de cromosomas (Pirrelo *et al.*, 2013).

Tabla 1. Especies del genero *Fragaria*, su nivel de ploidía y área de distribución.

Especie	Nivel de Ploidía (X)	Localización
<i>F. bucharica</i> Losinsk.	2X	Oeste del Himalaya.
<i>F. chinensis</i> Losinska.	2X	China.
<i>F. daltoniana</i> J. Gay.	2X	Himalaya.
<i>F. iinumae</i> Makino.	2X	Japón.
<i>F. mandshurica</i> Staudt.	2X	Norte de China.
<i>F. nilgerrensis</i> Schlecht.	2X	Suroeste de Asia.
<i>F. nipponica</i> Makino.	2X	Japón.
<i>F. nubicola</i> Lindl.	2X	Himalaya.
<i>F. pentaphylla</i> Losinsk.	2X	Norte de China.
<i>F. vesca</i> L.	2X	Europa, Asia Oeste de los Urales, dispar en Norte América.
<i>F. viridis</i> Duch.	2X	Europa y Asia.
<i>F. bifera</i> Duch.	2X	Francia y Alemania.
<i>F. corymbosa</i> Losinsk.	4X	Este de Rusia y China.
<i>F. gracilis</i> A. Los.	4X	Noroeste de China.
<i>F. moupinensis</i> (French.) Card.	4X	Norte de China.
<i>F. orientalis</i> Losinsk.	4X	Este de Rusia.
<i>F. tibetica</i> Staudt & Dickore.	4X	China.
<i>F. bringhurstii</i> Staudt.	5X, 9X	California.
<i>F. moschata</i> Duch.	6X	Euro-Siberia.
<i>F. chiloensis</i> (L.) Miller.	8X	Oeste de N. América, Hawaii, Chile.
<i>F. virginiana</i> Miller.	8X	Norte América.
<i>F. x ananassa</i> Duch. ex Lamarck.	8X	Cultivada Mundialmente.
<i>F. x ananassa</i> subsp. <i>Cuneifolia</i> .	8X	Noroeste de N. América.
<i>F. iturupensis</i> Staudt.	10X	Isla Itirup, Islas Kuriles.

Tabla 1: continuación.

Especie	Nivel de Ploidía (X)	Localización
<i>F. virginiana</i> subsp. <i>platypetala</i> Miller .	10X	Oregón, Estados Unidos.
<i>F. vesca</i> R. Bauer y A. Bauer .	10X	Cultivada en Europa.

Para los estudios mencionados anteriormente se ha utilizado citometría de flujo. Esta técnica permite de manera sencilla determinar el nivel de ploidía y contenido de ADN, de una planta en estudio. Se basa en el paso de un flujo núcleo a núcleo por un haz de luz incidente sobre ellos, con lo que se obtienen dos datos: el tamaño del núcleo y la rugosidad de este, además la adición de un fluorocromo que intercala con el ADN del núcleo, permite saber la cantidad de ADN de la muestra y el nivel de ploidía, cuando se comparan con especies controles (Galbraith y Lambert, 2011) (Figura 1). De esta manera se puede establecer el valor C, este se define como el valor de cromosomas haploides de una especie, siendo, 1C cuando se trata de haploides, 2C cuando son diploides y así sucesivamente (Bennet *et al.*, 2000).

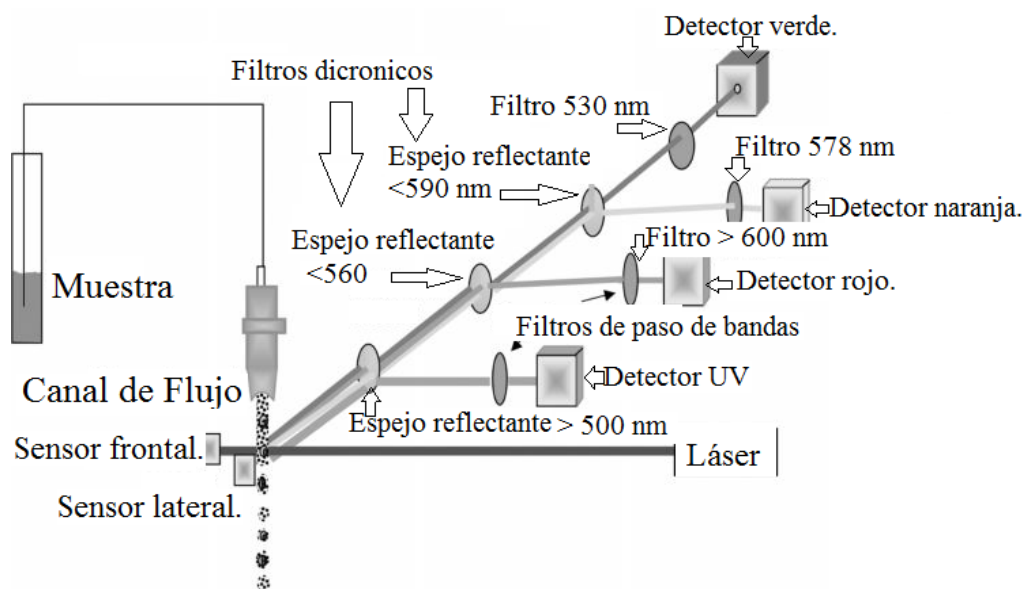


Figura 1: Funcionamiento interno de un citómetro de flujo, el sensor frontal determina el tamaño de los núcleos, mientras que el lateral la rugosidad, la emisión de fluorescencia es medida por detectores específicos para el fluorocromo usado, clasificada en distintas longitudes de onda por espejos y filtros. Modificado de Darzynkiewicz *et al.*, 2010.

El presente trabajo busca determinar el nivel de ploidía y contenido de ADN, mediante citometría de flujo, de distintas accesiones de *Fragaria chiloensis*, pertenecientes al banco de germoplasma ubicado en la Facultad de Ciencias Forestales en la Universidad de Concepción, Campus Concepción.

IV. Marco teórico.

4.1 La Frutilla chilena.

La frutilla chilena (*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.), es una planta octoploide ($2n=8X=56$), herbácea, rastrera, perenne y estolonífera. Posee hojas compuestas, pecioladas, agrupadas en rosetas, pubescentes, formadas por 3 folíolos de borde aserrado en el tercio superior, de forma aovados con el ápice redondeado y la base cuneada. Cada folíolo mide 2-4,5 x 2-3 cm. Las flores son hermafroditas formadas por 5 sépalos y 5 pétalos de color blanco, con presencia de numerosos estambres. El fruto consiste en un receptáculo carnoso de color rojo cubierto de pequeños aquenios (Muñoz, 1980) (Anexo, figura 1)

Es cultivada desde hace más de 1.000 años por los pueblos aborígenes de Chile, específicamente por los picunches y mapuches. Se cree que los picunches fueron los primeros en domesticar la especie, ya que antes del arribo de los españoles era cultivada en el centro y sur del país (Hancock *et al.*, 1999). Durante la conquista, los españoles diseminaron esta especie a varios países de Norte y Sudamérica, especialmente a Perú, Colombia, Ecuador y posteriormente a Europa, donde dio origen a la actual frutilla cultivada (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Figura 2). En 1766, Nicholas Duchesne determinó que la frutilla cultivada era un híbrido entre *F. chiloensis* y *Fragaria virginiana* Duch. (Hancock *et al.*, 1999). *F. chiloensis* se ubica desde los 47°33' de latitud norte hasta los 34°55' de latitud sur, desde el nivel del mar hasta los 1850 m de altitud (Carrasco *et al.*, 2007). El área mundial de cultivo de la especie es de 75-80 hectáreas a nivel mundial con un rendimiento de 3 a 5 toneladas por hectárea y una duración del cultivo de 6 a 8 años (Finn *et al.*, 2013). Tomando en cuenta las características morfológicas, existen dos formas botánicas: *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* f. *patagonica*, (Anexo; figura 1, imagen A) cuyas plantas producen un alto número de estolones y pequeños frutos rojos y *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* f. *chiloensis*, que genera menos estolones y frutos más grandes de color rosado blanquecino (Anexo; figura 1, Imagen B) (Carrasco *et al.*, 2007).

La especie constituye una importante fuente de recursos genéticos y caracteres agronómicos, como la capacidad de crecer bajo condiciones de estrés salino, resistencia a enfermedades, plagas y buenas características organolépticas como el sabor y aroma (Hinrichsen *et al.*, 1998)

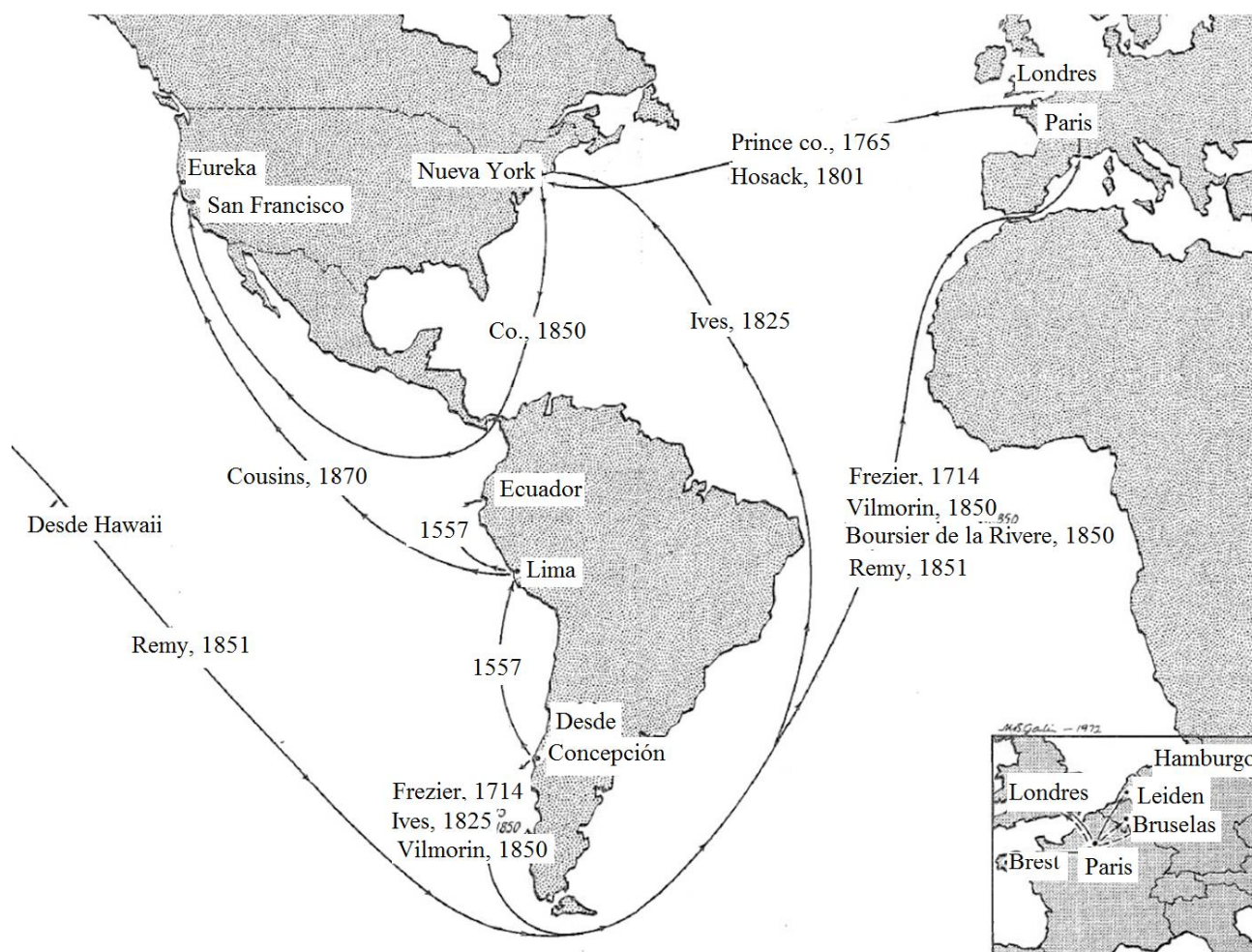


Figura 2: Origen y dispersión de *F. chiloensis*, adaptado de Finn *et al.*, 2013

4.2 La citometría de flujo como herramienta de estudio de los genomas vegetales.

El primer estudio citológico en plantas realizado por citometría de flujo, ocurrió en 1973, cuando Heller, preparó suspensiones nucleares de arvejas (*Pisum sativum* L.) a partir de puntas de raíces fijadas en alcohol-ácido acético, después de un tratamiento con pectinasas y pepsinas. El ADN nuclear fue teñido con bromuro de etidio y como resultado de la intensidad de fluorescencia, la técnica mostró un potencial uso para el análisis del

ciclo celular en plantas (Heller, 1973). No obstante este estudio pasó desapercibido por casi una década debido a que en esa época los citómetros eran máquinas caras dedicadas principalmente a investigaciones biomédicas (Dolezel y Bartos, 2005). Experimentos realizados en la década de los 80, demostraron que el contenido de ADN puede ser estimado mediante núcleos aislados a partir de protoplastos (Puite y Ten-Broeke, 1983; Galbraith, 1984; Ulrich *et al.*, 1988), sin embargo, esta manera de realizarlo era lenta, tediosa y no aplicable a un amplio rango de especies vegetales (Dolezel y Bartos, 2005). No fue hasta que en 1983, que Galbraith, optimizó la técnica, mediante el macerado de una pequeña muestra de material vegetal fresco en presencia de un buffer de aislamiento de núcleos (Galbraith, 1983). Este método fue sencillo, rápido y preciso, obteniéndose histogramas de alta calidad en un corto período de tiempo, lo que permitió a la citometría de flujo en plantas (CFP) a una serie de aplicaciones relacionadas con la estimación del contenido de ADN, las que varían desde investigación básica hasta programas de mejoramiento de especies vegetales y producción de semillas (Dolezel y Bartos 2005).

Dentro de los usos más destacados de la CFP, está la determinación del nivel de ploidía, la que a diferencia del método tradicional de conteo de cromosomas, mediante el uso de meristemas apicales de raíz, detenidos en la metafase, no requiere de mucho tiempo, además de tejido específico, como lo es el tejido celular en división (Ochatt, 2008). La CFP ha permitido establecer tanto el nivel de ploidía como el contenido de ADN, (Sharma *et al.*, 1983; Galbraith, 1984) siendo su aplicación más difundida. A partir de estos estudios una serie de experimentos han usado la CFP, para el análisis del nivel de ploidía como resultado de experimentos de haplo-diploidización o duplicación de cromosomas en plantas (Sharma *et al.*, 1983; Nehra *et al.* 1990, Ochatt *et al.*, 2005; Dolezel *et al.*, 2007). Estos estudios se basan en que un estándar conocido es leído y analizado junto a una suspensión nuclear del genotipo de interés y la posición del pico de la fase G1 del estándar es usada para establecer el nivel de ploidía de la muestra en estudio. La creación de aparatos pequeños y asequibles, capaces de medir tanto fluorescencia y dispersión de la luz, han provisto a un método accesible y rápido, usando muestras vegetales, frescas, secas (Suda *et al.*, 2006; Roberts 2007) y congeladas (Chiatante *et al.*, 1990; Hopping 1993) para la determinación del tamaño del genoma (Koné *et al.*, 2007),

eventos de endo-poliploidía (Nehra *et al.* 1990; Brandizzi *et al.*, 2000; Lemontey *et al.*, 2000; Ochatt *et al.*, 2001; Ochatt, 2006) y estudios del ciclo celular. Varias especies vegetales han sido estudiadas de esta manera, las que se incluyen monocotiledóneas como el plátano (*Musa x paradisiaca* L.), espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y ballica (*Lolium perenne* L.) (Roux *et al.*, 2001; Ozaki *et al.*, 2004; Barker *et al.*, 2001) y especies dicotiledóneas como el lúpulo (*Humulus lupulus* L.) la frutilla (*Fragaria x ananassa*), *Datura stramonium* L., *Hyoscyamus niger* L. y *Arabidopsis thaliana* L. (Sesek *et al.*, 2000; Nehra *et al.*, 1990; Weber *et al.* 2008; Galbraith y Lambert 2011).

Otro uso de la CFP es la caracterización de genotipos fieles a su tipo de tejido; existen un gran número de ejemplos en que esta técnica ha ayudado al rápido desarrollo industrial de genotipos creados por manipulación de la ploidía mediante técnicas de cultivo *in vitro* (Nehra *et al.*, 1990; Van Duren *et al.*, 1996, Brandizzi *et al.*, 2000; Ochatt *et al.*, 2005), como también a estudios más extensos en los que se incluye la detección de aneuploidías, poliploidías, endoreduplicaciones y análisis de citotipos normales o anormales (Yanagi *et al.*, 2010; Galbraith y Lambert 2011). Este ámbito es importante ya que permite establecer relaciones tejido-tipo-verdadero, o sea establecer cuál es el origen de expresión de los tejidos o plantas en estudio y caracterizar diversos genotipos resultantes de programas de mejoramiento vegetal convencionales (Ochatt *et al.*, 2002; Ochatt *et al.*, 2004,) o por cultivo de tejido *in vitro* (Nehra *et al.*, 1990; Van Duren *et al.*, 1996, Brandizzi *et al.*, 2000)

La CFP ha sido relevante para los estudios citológicos, ligados al sexo de las plantas los que incluyen la localización de cromosomas específicos para el sexo, la localización de cromosomas supranumerarios y el “sorting” o separación de cromosomas para el mapeo físico de los genomas (Dolezel y Göhde, 1995). Respecto a los cromosomas sexo específicos, han sido identificados en pocas plantas mediante la estimación de cantidad de ADN, en los que la presencia de dos picos no sobrepuestos entre sí han sido identificados para ambos sexos (Dolezel y Göhde, 1995).

Además por su alta eficacia, ha sido seleccionada como técnica para la identificación de aneuploidías, particularmente desarrolladas para cultivos con importancia económica, destacándose los cereales (Dolezel *et al.*, 2007). Así ha ayudado significativamente a la

selección de cito tipos deseados después de la manipulación de su ploidía (Lionneton *et al.*, 2001, Roy *et al.*, 2001) e hibridación (Ochatt *et al.*, 2004), incluyendo la detección de citoquimeras (Roux *et al.*, 2001). También la técnica ha sido usada para el estudio de protoplastos con una amplia gama de objetivos (Harkins y Galbraith 1984; Galbraith *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1984). En otros estudios relacionados, se ha estimado el contenido de clorofila (Li y Arumugunathan, 2001), medido el contenido de ADN en células aisladas (Galbraith y Shields, 1982) o protoplastos viables (Ochatt *et al.*, 2000), estudiado la permeabilidad de la membrana en la caracterización de lupinos (*Lupinus alba* L.) relacionándolo con la tolerancia al estrés por déficit hídrico (Gantet *et al.*, 1990), la inducción de apoptosis (Lei *et al.*, 2003; Cronje *et al.*, 2004) y la cuantificación de alcaloides (Yanpaisan *et al.*, 1999) y antocianinas (Sakamoto *et al.*, 1994).

Adicionalmente el uso de CFP ha determinado el contenido de varias sustancias sub-celulares, como componentes de la pared celular, marcadores apoptóticos unidos a componentes celulares (Loureiro *et al.*, 2006; Cvikrova *et al.*, 2003) y otras sustancias marcadas capaces de emitir fluorescencias cuando son excitadas por la luz UV u otras disponibles en el equipo. Así la CFP ha sido utilizada para caracterizar cloroplastos intactos y tilacoides (Schroeder y Petit, 1992). Los diferentes tipos de tilacoides encontrados en cloroplastos de maíz (*Zea mays* L.), pudieron ser caracterizados por las distintas intensidades de fluorescencias de éstos (Kaush y Bruce, 1994). Además ha ayudado al estudio de los cambios cinéticos en el potencial de membrana, mediante mitocondrias aisladas, etiquetadas con fluorocromo específico como la concavalina A y la rodamina 123 (Petit *et al.*, 1986; Petit, 1992).

Finalmente la CFP se ha usado para el análisis de fraccionamiento de la pared celular. Se ha demostrado que el fenómeno de endo-reduplicación, precede a la elongación celular en *Arabidopsis thaliana*. De esta manera cuando un pico de 8C aparece muy pronto, implicaría que el comienzo de la fase de embriogénesis resulta en una modificación de la forma celular, debido a las células en elongación (Gendreau *et al.*, 1997). Se sabe que al inicio de la embriogénesis en células aisladas el crecimiento es de tipo-bipolar, en el cual las células crecen en longitud, de manera opuesta al crecimiento diametral de células no embriogénicas, en división activa (Ammirato *et al.*, 1983). Sin embargo, estudios

destinados a distinguir entre la ampliación celular y elongación en raíces de *Arabidopsis thaliana*, no han podido explicar este proceso en embriones (Sugimoto *et al.*, 2001).

4.3 La citometría de flujo aplicada al estudio de frutillas.

En la investigación de Yanagi *et al.*, (2010), se utilizó esta técnica para conocer la ploidía de híbridos resultantes de la cruce de *Fragaria x anannasa* (octoploide) y *Fragaria vesca* (diploide), obteniendo organismos pentaploides, hexaploides y aneuploides. Estos últimos son organismos con una o varias copias de cromosomas sin llegar a ser un juego completo (Cullis, 2004). Resultados similares se obtuvieron al cruzar las mismas especies mencionadas anteriormente, junto con *Fragaria nilgerriensis* L. (diploide), obteniéndose tetraploides, pentaploides y octaploides (Rho *et al.*, 2012). En el estudio de Hummer *et al.*, (2009), se descubrió que la especie *Fragaria iturupensis* Staudt (octoploide), presentaba un caso de decaploidia en una de las poblaciones del estudio. Además, la citometría de flujo ha servido para comparar la ploidía de plantas de *Fragaria x anannasa* obtenidas por cultivo *in vitro*, tanto de meristemas como de explantes de hoja, con plantas obtenidas por reproducción asexual mediante estolones (Brandizzi *et al.*, 2000). También, se ha usado para evaluar si existe hibridación natural en zonas próximas a campos de cultivo de *Fragaria x anannasa* cercanos a poblaciones naturales de *Fragaria vesca* (Schulze *et al.*, 2010). Finalmente se ha determinado si el origen y la edad de plantas producidas por callos *in vitro* afecta el nivel de ploidía, determinándose que a medida que los callos envejecían la ploidía de estos se duplicaba, obteniéndose callos con ploidías de 16C, 32C y 64C (Nehra *et al.*, 1990)

V. Hipótesis.

En vista de la amplia distribución geográfica de *Fragaria* nativas, en Chile, existen diferencias en el nivel de ploidía y contenido de ADN de distintas accesiones de *Fragaria* nativas, debido al origen geográfico de estas, siendo detectables usando citometría de flujo.

VI. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

Determinar el nivel de ploidía y contenido de ADN de distintas accesiones de *Fragaria* nativa, utilizando citometría de flujo.

6.2 Objetivos específicos.

- Estandarizar una metodología para determinar el nivel de ploidía y contenido de ADN en distintas accesiones de *Fragaria* nativa, para aplicarla en citometría de flujo.
- Definir el nivel de ploidía y contenido de ADN, en distintas accesiones de *Fragaria* nativa, mediante citometría de flujo.

VII. Metodología.

7.1 Material vegetal.

El material vegetal utilizado para el estudio proviene de distintas accesiones de *Fragaria* nativa (Anexo, tabla 1, fig. 1), junto con *F. vesca* var. Hawaii (Anexo, fig. 2) *F. x ananassa* cv. Aromas (Anexo, fig. 3), *Arabidopsis thaliana* (Anexo, fig. 5), como especie control para determinar la elección del buffer óptimo y *Hordeum vulgare* (Anexo, fig. 4), como especie control para los estudios citométricos.

7.2 Elección del buffer de extracción de núcleos.

Para evaluar cuál buffer mostraba la mayor capacidad para la extracción de núcleos íntegros y teñidos, se usaron 7 buffers distintos, 6 de estos son los buffers más usados para la extracción de núcleos (Galbraith, LB01, Arumugunatan y Earle, Marie, Otto y Tris-MgCl₂) y uno es la modificación del buffer Bors (Tabla 2). El procedimiento para los buffers Galbraith, LB01, Arumugunatan y Earle, Marie y Bors modificado, fue el siguiente: todo el procedimiento fue realizado en hielo, se pesaron por separado en una balanza analítica (ADAM, Inglaterra), aproximadamente 100 mg de hojas jóvenes y sanas de *A. thaliana*, y *F. chiloensis* (Accesión: MAN). Estas fueron maceradas, por separado, con una hoja de afeitar (Schick, Alemania), por 2 a 3 min, en placas petri de plástico de 60 mm, adicionándose 1,5 ml de buffer de extracción con una micropipeta (Nichiryo, Japón), recuperándose 1 ml aproximadamente con otra micropipeta (Nichiryo, Japón), después la solución fue pasada por un filtro de poro de 35 µm (tubo de 5ml, PS, filtro de células, BD cat. 352235.) y las muestras se incubaron con 2,5 µl de RNAsa (Life technologies, Purelink Invitrogen 1209-021, Estados Unidos) por 15 min en hielo, luego se incubaron con 50 µl de yoduro de propidio (Santa Cruz Biotechnology, SC-3541, Estados Unidos) en hielo y en oscuridad por 30 min (Galbraith 1983). Finalmente se procedió al análisis citológico de la solución mediante el equipo (FACS ARIA III, Becton Dickinson, Estados Unidos), con la siguientes especificaciones, ancho de boquilla 70 µm, Voltajes: FSC: 150 V, SSC: 357 V, PE: 409V, PercP-Cy5.5: 269V. Umbral: 2000.

Para el buffer Otto se siguió el siguiente procedimiento: se pesaron aproximadamente 100 mg de hojas jóvenes y sanas de *F. chiloensis* (Accesión: MAN) y *A. thaliana* como control. Estas fueron maceradas, con una hoja de afeitar, por 2 a 3 min., en placas petri de plástico de 60 mm, a temperatura ambiente en presencia de 1 ml de buffer de extracción (buffer Otto 1) recuperándose 500 µl aproximadamente con micropipeta, después la solución fue pasada por un filtro de poro 35 µm. A esta solución se le adicionaron 10 µl de solución de tinción de yoduro de propidio (concentración 1 mg/ml). (Otto, 1990), Se dejó reposar por 10 min antes de pasar la solución por citómetro (FACS ARIA III, Becton Dickinson, Estados Unidos) con la especificaciones mencionadas anteriormente.

Tabla 2: Nombre, composición y referencias de los distintos buffers estudiados en esta tesis.

Nombre de buffer	Composición	Referencias
Buffer Galbrith	MgCl 45 mM; citrato de sodio 30mM; MOPS 20 mM; Triton X-1000,1 % (p/v); pH 7.0	Galbraith <i>et al.</i> , 1983
LB01	TRIS 15 mM; Na ₂ EDTA 2 mM; espermina-4HCL 0,5 mM; KCl 80mM; NaCl 20 mM; β-mercaptoetanol 15 mM; Triton X-100 0,1 % (p/v); pH 7.5	Dolezel <i>et al.</i> , 1998
Arumugunathan y Earle	MgSO ₄ -7H ₂ O 9,53 mM; KCl 47,67 mM; HEPES 4,77 mM; DTT 6,48 mM; Triton X-100 0,25% (p/v); pH 8.0	Arumugunathan y Earle 1991
Buffer de aislamiento de núcleos de Marie	glucosa 50 mM; KCl 15 mM; NaCl 15mM; Na ₂ EDTA 5 mM; citrato de sodio 50 mM; Tween 20 0,5 % (v/v); HEPES 50 mM; β-mercaptoetanol * 0.5 % (v/v); pH 7,2	Marie y Brown 1993
Buffer Otto	100 mM ácido cítrico; 0,5 % (v/v) Tween 20; pH 2.3	Otto 1990
Tris-MgCl ₂	200 mM TRIS; 4 mM MgCl ₂ -6H ₂ O; 0,5 % v/v Triton X-100; pH 7.5	Pfossier <i>et al.</i> , 1995
Buffer Bors modificado	Glucosa 50 mM; KCl 15 mM; NaCl 15mM; Na ₂ EDTA 5 mM; citrato de sodio 50 mM; Tween 20 0,5 % (v/v); HEPES 50 mM; β-mercaptoetanol * 5 % (v/v)**; 0,5 % espermina, 1% PVP; pH 7,2	Bors 2000

*: el β-mercaptoetanol se agrega fresco al buffer antes de su uso. ** El buffer original ocupa una concentración de 0,5 % (v/v) de β-mercaptoetanol.

7.3 Análisis citológicos.

Una vez determinado que el buffer Bors modificado fue el óptimo para la extracción de núcleos, se realizaron los análisis citológicos pertinentes en cincuenta y siete accesiones distintas de *F. chiloensis*. Como especies control para el nivel de ploidía se usó *F. vesca* var. Hawaii y *F. x ananassa* cv. Aromas, como control diploide y octoploide, respectivamente. Para la cuantificación del contenido de ADN se usó a *Hordeum vulgare* como especie control. Para determinar el nivel de ploidía se pesaron en balanza analítica, 100 mg de hojas jóvenes y sanas, previamente almacenadas a 4° C por 24 a 72 h, de *F. chiloensis*, *F. vesca* y *F. x ananassa* por separado, luego fueron maceradas con una hoja de afeitar en placas petri de plástico de 60 mm de diámetro sobre hielo en 1000 µl de buffer Bors modificado. El sobrenadante fue recurado con una micropipeta de 1000 µl recuperándose aproximadamente 500 µl. Esta solución fue limpiada mediante su paso por tubos con filtro de poro 35 µm. Una vez filtrados se le adicionó 2,5 µl de RNAsa (Life technologies, Purelink Invitrogen 1209-021, Estados Unidos), dejándose incubar a 4° C. durante 15 min. Pasado este tiempo al sobrenadante se le incorporó 50 µl de PI y se le dejó reposar por 30 min a 4° C. Finalmente se pasó la solución por el citómetro (FACS ARIA III, Becton Dickinson, Estados Unidos), con las especificaciones descritas anteriormente.

Para la determinación del contenido de ADN, se pesaron por separado 100 mg de hojas jóvenes, sanas y conservadas a 4° C. de *H. vulgare*, junto a 100 mg de hojas jóvenes, sanas y mantenidas a 4° C de *F. vesca* var. Hawaii, *F. x ananassa* cv. Aromas, y *F. chiloensis* (Accesión: MAN) en una balanza analítica, cada una de estas combinaciones fue pesada por separado. Luego fueron maceradas con una hoja de afeitar en placas petri de plástico de 60 mm de diámetro sobre hielo, en 1 ml de buffer Bors modificado. El sobrenadante fue recurado con una micropipeta, recuperándose aproximadamente 500 µl. Esta solución fue limpiada mediante su paso por tubos con filtro de 35 µm. Una vez filtrados se le adicionó 2,5 µl de RNAsa, dejándose incubar a 4° C durante 15 min. Pasado este tiempo al sobrenadante se le incorporó 50 µl de PI y se le dejó reposar por 30 min a 4° C. Finalmente se pasó la solución por el citómetro, con las especificaciones mencionadas anteriormente.

Para la determinación del nivel de ploidía se utilizó la siguiente fórmula:

Nivel de Ploidía

$$= \left(\frac{\text{Valor medio del pico de ADN de la muestra}}{\text{Valor medio del pico de ADN del control}} \right) \times \text{Nivel de ploidia del control}(x)$$

Para el contenido de ADN se usa la siguiente formula:

Contenido de ADN:

$$= \left(\frac{\text{Valor medio del pico de ADN de la muestra}}{\text{Valor medio del pico de ADN del control}} \right) \times \text{contenido de ADN del control}(pg)$$

7.4 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Dunnett, con un $\alpha \leq 0,05$, en el programa computacional STATISTICA v.7. Se usó esta prueba estadística ya que permite establecer diferencias significativas cuando se compara una especie control respecto de las otras muestras.

Test de Dunnett.

$$X_i - X_j > d_{\alpha}(k-1, k(n-1)) \times \sqrt{M.S.C.E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

$$M.S.C.E = S_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^k (n_i - 1) S_i^2}{N - k}$$

Dónde: $nk = N \rightarrow ni \neq nj$.

VIII. Resultados

8.1 Elección del buffer de extracción de núcleos.

Los ensayos realizados para determinar el buffer de extracción de núcleos dieron excelentes resultados para la planta control *A. thaliana* (Fig. 3, gráficos a, b, c, d, e, f, g), sin embargo, para la planta en estudio *F. chilensis*, no se pudo apreciar óptimos resultados en varios de los buffers utilizados (Fig. 4, gráficos: a, c, d, e) mostrando en otros buffers mejores resultados (Fig. 4, gráficos: b, f, g) Se determinó que el buffer con el mejor resultado fue Bors modificado, ya que este presentó una mejor resolución en comparación con los otros, además de una mayor cantidad de núcleos teñidos por el fluorocromo.

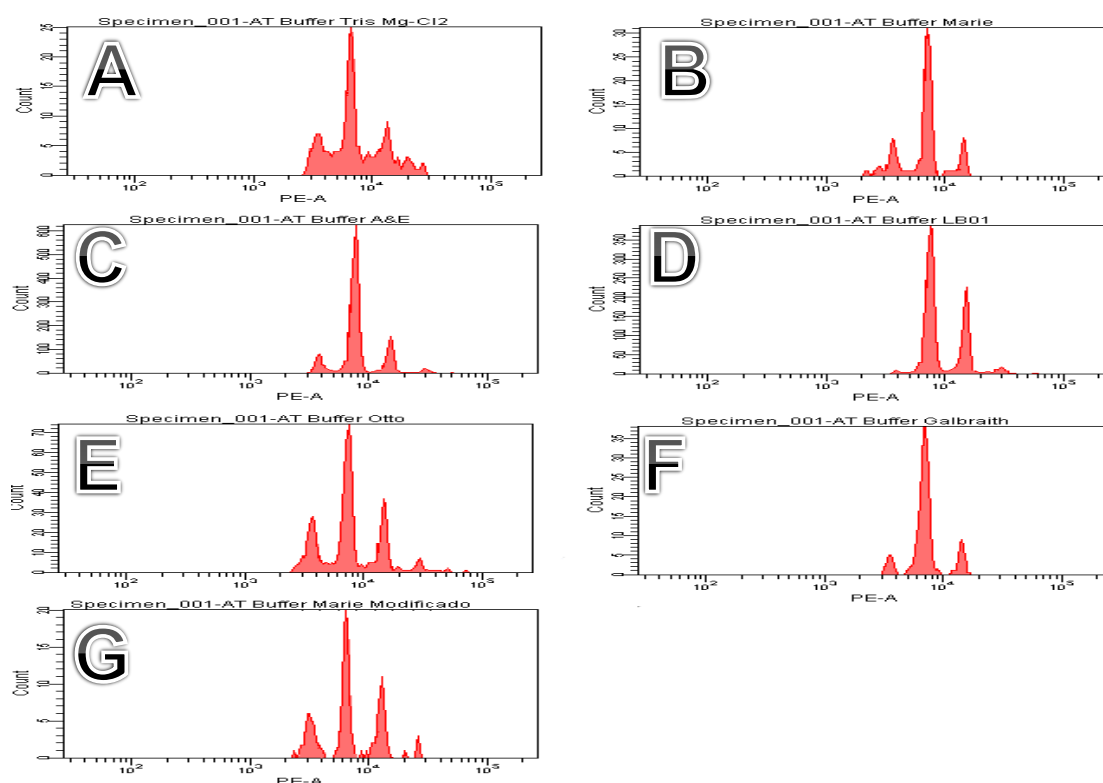


Figura 3: Aplicación de distintos buffers de extracción de núcleos en *Arabidopsis thaliana*, A: buffer Tris-MgCl₂, B: buffer: Marie, C: buffer: Arumugunatan y Earle, D: buffer LB01, E: buffer Otto, F: buffer Galbraith y G: buffer Bors modificado. En el eje de las abscisas se muestra la intensidad de la fluorescencia, en el eje de las ordenadas el número de núcleos.

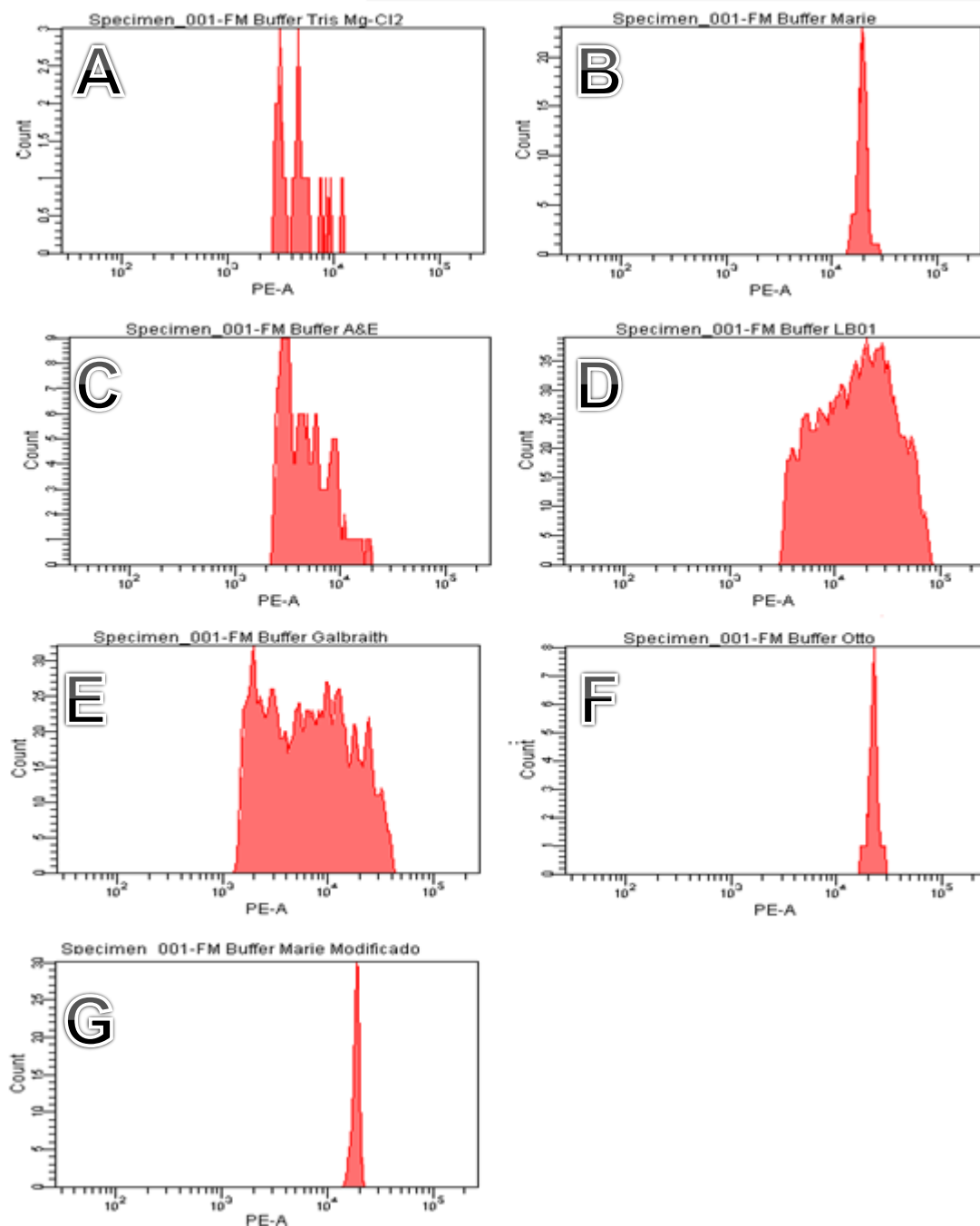


Figura 4: aplicación de distintos buffers de extracción de núcleos en *F. chilensis*, A: buffer Tris-MgCl₂, B: buffer: Marie, C: buffer: Arumugunatan y Earle, D: buffer LB01, E: buffer Otto, F: buffer Galbraith y G: buffer Marie modificado. En el eje de las abscisas se muestra la intensidad de la fluorescencia, en el eje de las ordenadas el número de núcleos.

8.2 Determinación del nivel de ploidía y contenido de ADN.

En cuanto al nivel de ploidía estimado, la mayoría de las accesiones no mostraron diferencias significativas respecto al control octoploide *F. x ananassa*, por consiguiente todas serían octoploides, con la excepción de la accesión MEN, Menetue, (Figura 5) la que si mostró diferencias significativas con el control octoploide y no con el control diploide, *F. vesca*, por lo tanto se trataría de una especie diploide (Tabla 3). Al igual que los resultados en el nivel de ploidía, el contenido de ADN de las accesiones, no mostraron diferencias con el control octoploide, salvo el caso de la accesión MEN, la que si mostró diferencias con ese control y no con el diploide (Tabla 4). En la figura 6 del anexo se puede ver la hoja de resultados o “spreadsheet” que entrega el citómetro mediante el programa computacional FACS DIVA 6.0.



Figura 5: Ejemplar de la accesión diploide encontrada en este estudio, posiblemente *Fragaria vesca*.

Tabla 3: Resultados de los análisis citométricos, para la determinación del nivel de ploidía de 57 accesiones de *F. chilensis* y dos especies control *F. x ananassa* (ARO) y *F. vesca* (VES). Letras distintas indican diferencias significativas entre las accesiones mediante la prueba de Dunnett, con un $\alpha \leq 0,05$.

Accesión	Nivel de Ploidía (x)	Accesión	Nivel de Ploidía (x)
ALE	7,50±0,47a	MAH	7,52±0,57a
ARO	8,00±0,46a	MAL	8,46±0,14a
CAU	7,74±0,11a	MAN	7,71±0,39a
CAU2	7,76±0,17a	MAÑ1	7,67±0,14a
CHA	7,52±0,37a	MAÑ2	8,17±0,31a
CHI	7,55±0,7a	MAR	7,92±0,19a
CHI2	7,73±0,41a	MEN	2,02±0,23b
CHL	8,31±0,09a	MOL	7,82±0,55a
CNT	7,57±0,23a	NAH	8,24±0,48a
CNT2	7,74±0,34a	NAH2	8,46±0,47a
COC	8,09±0,62a	NAH3	7,69±0,64a
COL2	8,54±0,3a	NEL	8,21±0,08a
COL3	7,72±0,64a	PET	8,32±0,19a
CRC	7,51±0,58a	PFA	7,98±0,45a
CUC	7,58±0,3a	PFA2	7,54±0,52a
CUC2	7,68±0,14a	PIN	8,19±0,11a
CXM	7,89±0,21a	PUN	8,42±0,19a
GUT	7,83±0,2a	QUE	7,67±0,56a
HUA	8,22±0,34a	RAM	7,79±0,38a
HUE	8,10±0,12a	RAN2	7,42±0,35a
HUE2	8,22±0,25a	RAN3	7,50±0,47a
HUE3	8,40±0,42a	SAV	8,48±0,3a
HUE4	8,37±0,19a	TRA	7,54±0,74a
LIC	7,66±0,5a	TRA2	8,09±0,82a
LIN	7,91±0,15a	TST	7,51±0,49a
LIR	7,41±0,69a	VAL	7,87±0,28a
LLE	7,66±0,45a	VAL2	7,90±0,18a
LLE2	7,66±0,7a	VES	2,17±0,08b
LOB	8,03±0,06a		

Tabla 4: Resultados de los análisis citométricos, para la determinación del contenido de ADN, de 57 accesiones de *F. chiloensis*, además de *F. x ananassa* y *F. vesca*. Letras distintas indican diferencias significativas entre las accesiones según la prueba de Dunnett, con un $\alpha \leq 0,05$.

Accesión	Cont. ADN (pg)	Accesión	Cont. ADN (pg)
ALE	1,22±0,08a	MAH	1,22±0,09a
ARO	1,30±0,08a	MAL	1,38±0,02a
CAU	1,26±0,02a	MAN	1,26±0,06a
CAU2	1,26±0,03a	MAÑ1	1,25±0,02a
CHA	1,22±0,06a	MAÑ2	1,33±0,05a
CHI	1,23±0,11a	MAR	1,29±0,03a
CHI2	1,26±0,07a	MEN	0,33±0,04b
CHL	1,35±0,01a	MOL	1,27±0,09a
CNT	1,23±0,04a	NAH	1,34±0,08a
CNT2	1,26±0,06a	NAH2	1,38±0,08a
COC	1,32±0,1a	NAH3	1,25±0,1a
COL2	1,39±0,05a	NEL	1,34±0,01a
COL3	1,26±0,1a	PET	1,35±0,03a
CRC	1,22±0,09a	PFA	1,30±0,07a
CUC	1,23±0,05a	PFA2	1,23±0,08a
CUC2	1,25±0,02a	PIN	1,33±0,02a
CXM	1,29±0,03a	PUN	1,37±0,03a
GUT	1,28±0,03a	QUE	1,25±0,09a
HUA	1,34±0,06a	RAM	1,27±0,06a
HUE	1,32±0,02a	RAN2	1,21±0,06a
HUE2	1,34±0,04a	RAN3	1,22±0,08a
HUE3	1,37±0,07a	SAV	1,38±0,05a
HUE4	1,36±0,03a	TRA	1,23±0,12a
LIC	1,25±0,08a	TRA2	1,32±0,13a
LIN	1,29±0,02a	TST	1,22±0,08a
LIR	1,21±0,11a	VAL	1,28±0,05a
LLE	1,25±0,07a	VAL2	1,29±0,03a
LLE2	1,25±0,11a	VES	0,35±0,01b
LOB	1,31±0,01a		

En cuanto a la especie control para determinar el contenido de ADN, *H. vulgare*, esta mostró ser la indicada para el estudio (Figura 6, gráficos a, b y c). Debido a que los picos no se superponen entre sí, muestra resultados fáciles de interpretar al usar el buffer aplicado y la especie es de rápido crecimiento.

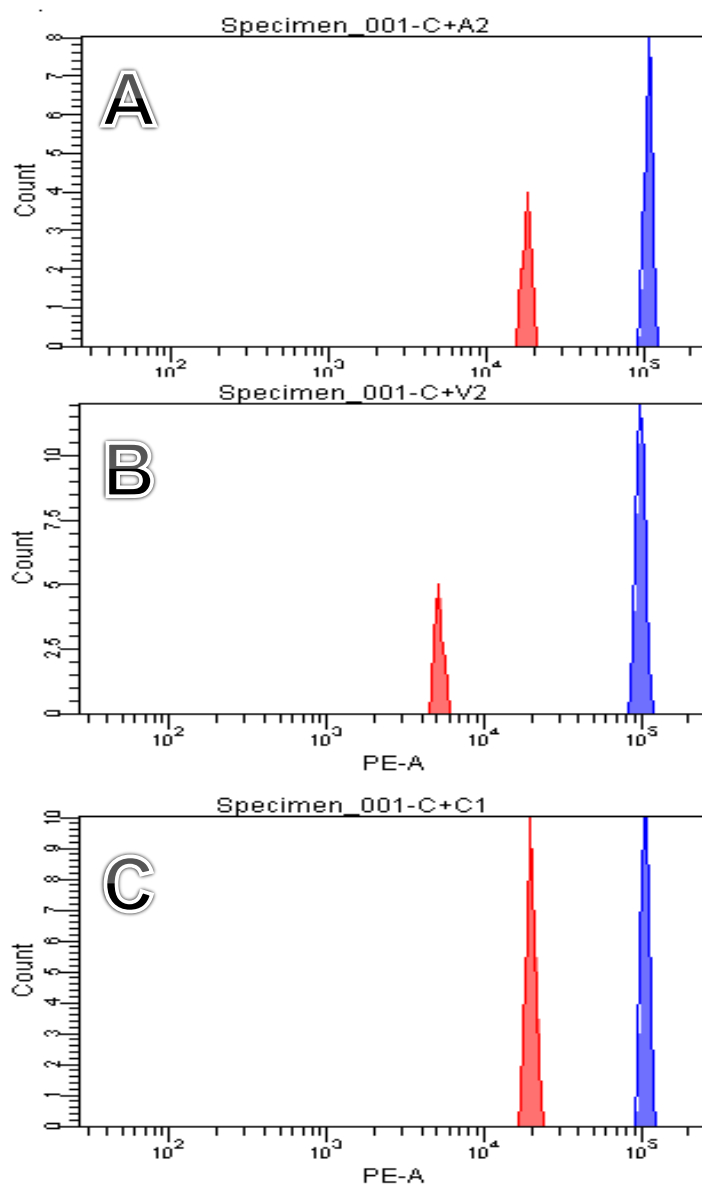


Figura 6: Gráficos obtenidos al determinar el contenido de ADN por comparación entre: en A, *H. vulgare* (pico de color azul) y *F. x ananassa*. (pico de color rojo) En B: *H. vulgare* (pico de color azul) y *F. vesca* (pico de color rojo) y en C *H. vulgare* (pico de color azul) y *F. chiloensis* (pico de color rojo) En el eje de las abscisas se muestra la intensidad de la fluorescencia, en el eje de las ordenadas el número de núcleos.

IX. Discusión.

9.1 Aplicación del buffer en estudio

Los reactivos que componen a los distintos buffers usados en el estudio presentan características que permiten la determinación del contenido de ADN y nivel de ploidía en estudios citológicos. Los componentes reductores presentes en el buffer Bors modificado evitan la hibridación de metabolitos secundarios, como fenoles y antocianinas, con el fluorocromo usado en este trabajo, lo que da como resultados lecturas de mediana o alta calidad (Jedrzczyk y Sliwinska, 2010) (Figura 3, letra G). La presencia de cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y espermina ayudan a la estabilización de la cromatina nuclear (Galbraith, 1983; Dolezel *et al* 1989; Arumugunathan y Earle, 1991; Pfosser *et al*, 1995; Bors, 2000). Para prevenir la aglutinación, además de mantener la integridad de los núcleos se adiciona (Marie y Brown, 1993). Agentes quelantes de iones metálicos como el EDTA y el citrato de sodio, permiten la unión de cationes divalentes, deteniendo la actividad de algunas enzimas (Galbraith, 1983; Dolezel *et al* 1989; Marie y Brown, 1993). Además, la adición de cloruro de potasio (KCl) y el cloruro de sodio (NaCl), sales inorgánicas, mejora la eficiencia de quelación (Dolezel *et al.*, 1989; Marie y Brown, 1993). Los buffers orgánicos (TRIS, MOPS, HEPES) mantienen el pH de las soluciones entre 7 y 8, siendo compatibles con el fluorocromo usado en el estudio. Para poder eliminar remanentes citoplasmáticos presentes en la superficie nuclear, degradar cloroplastos y reducir la formación de agregados nucleicos y citoplasmáticos se adicionan detergentes no-iónicos como Triton X-100 y Tween 20. Para evitar la interferencia de compuestos fenólicos con el fluorocromo en estudio se agregaron compuestos reductores (β -mercaptoetanol, DTT, PVP) los que además, preservan la cromatina proteica (Jedrzczyk y Sliwinska, 2010). Debido que el β -mercaptoetanol puede ser hepatóxico para el ser humano, se ha recomendado su remplazo por otros compuestos como la polivilpirrolidona (Bors, 2000). Debido a la capacidad del PI de reconocimiento a la hebra de ADN de manera intercalante y no nucleótido selectiva (Prosperi *et al.*, 1991, Rayburn *et al.*, 1992, Jedrzczyk y Sliwinska, 2010), las variaciones en la condensación de la cromatina como resultado del crecimiento celular en algunos tipo de tejido vegetal, puede afectar la estimación del contenido de ADN (Jedrzczyk y Sliwinska, 2010), por lo cual se recomienda usar tejido vegetal de la misma edad (Galbraith *et al.*, 1998). La mayoría de

los estudios realizados en el género *Fragaria* utilizan como fluorocromo DAPI, debido a que, a diferencia del PI no intercala con el ARN, haciéndose necesario la utilización de RNAsa (Schulze *et al.*, 2011; Yanagi *et al.*, 2010; Rho *et al.*, 2012). No obstante existen pocos estudios que han usado PI como fluorocromo (Brandizzi *et al.*, 2000; Guimaraes *et al.* 2013), debido posiblemente, a las capacidades operativas de los equipos.

Otros buffers usados para determinar ploidía en el género *Fragaria* han sido: Galbraith, utilizado para determinar diferencias en el nivel de ploidía de callos de *F. x ananassa* de distintas edades (Nehra *et al.*, 1990). También se usó para determinar si existe hibridación natural entre individuos de *F. x ananassa* con *F. vesca*, con la diferencia de que se le adicionó PVP para mejorar los resultados de los análisis (Schulze *et al.*, 2011). Otros estudios relacionados con el cruce artificial de especies del genero *Fragaria* han utilizado kits comerciales para la extracción de núcleos y en la solución de tinción se encuentran los estabilizadores, agentes quelantes, detergentes iónicos y antioxidantes (Yanagi *et al.*, 2010; Rho *et al.*, 2012). Para el estudio del nivel de ploidía en plantas originadas por estolones y mediante callos *in vitro* se ha usado buffer LB01 (Brandizzi *et al.*, 2000). Finalmente para la estimación del contenido ADN de distintos cultivares de *F. x ananassa* se utilizó buffer Marie (Guimaraes *et al.*, 2013).

9.2 Uso de *Hordeum vulgare* como control.

En cuanto a la especie control para el contenido de ADN, esta mostró ser apropiada para el estudio. Un estándar referencial de ADN debe poseer un tamaño de genoma cercano al de la muestra problema, para evitar errores en la correlación de estos, al aplicarse correcciones y amplificaciones de la señal de fluorescencia sobre la muestra (Bagwell *et al.*, 1989). Además tanto la estructura de la cromatina del patrón y la muestra en estudio deben ser similares y los núcleos de ambas deben reaccionar de la misma manera con los componentes de la tinción para la medición del contenido de ADN (Dolezel y Bartos 2005). La muestra control debe ser genéticamente estable al igual que su tamaño de genoma, fácil de usar y estar disponible en cantidades suficientes. Finalmente el tamaño del genoma del estándar debe ser lo suficientemente conocido (Dolezel y Bartos, 2005). El estándar usado en esta tesis cumple con casi todos los requerimientos mencionados anteriormente, salvo la cercanía al genoma de la especie en estudio, no obstante los

análisis realizados mostraron histogramas claros y separados entre sí (Figura 6, letras A, B y C). Para el análisis de contenido de ADN en el género *Fragaria* se han usado como control eritrocitos de pollo teñidos (Nehra *et al.*, 1990), leucocitos humanos teñidos (Brandizzi *et al.*, 2000), lechuga (*Lactuca sativa* L.), *Ilex crenata* Thunb. F. (Hummer *et al.*, 2009) arroz (*Oriza sativa* L.) (Yanagi *et al.*, 2010), cebolla (*Allium cepa* L.) (Rho *et al.*, 2012) y arveja (*Pisum sativum* L.) (Guimaraes *et al.*, 2013).

9.3 Variaciones en nivel del genoma.

Respecto del tamaño del genoma, las variaciones intra-específicas han sido reportadas en diversas especies vegetales, por ejemplo soya (*Glycine max* L.) (Graham *et al.*, 1994; Rayburn *et al.*, 1997; Coate *et al.*, 2012) girasol (*Helianthus annuus* L.) (Michaelson *et al.*, 1991) arveja (*Pisum sativum*) (Arumugunathan y Earle, 1991) y maíz (*Zea mays* L.) (Rayburn *et al.*, 1989). En algunos casos la variación se correlaciona con el medio ambiente y variaciones micro-climáticas y en otras con condiciones de cultivo (Kalendar *et al.*, 2000). Sin embargo, el valor de ploidía entre las diferentes accesiones estimadas por citometría de flujo, no difiere estadísticamente, al igual que el contenido del ADN de estas. (Tablas 3 y 4). Para el caso del género *Fragaria* se ha documentado la duplicación del nivel de la ploidía a medida que pasa el tiempo, en callos obtenidos de hojas *in vitro* y hojas de invernadero de *F. x ananassa*, esto estaría relacionado con la cantidad de citoquininas presentes en el medio de cultivo de los callos (Nehra *et al.*, 1990). En el estudio de Brandizzi *et al.*, 2000, también se observaron eventos de endo-reduplicación de cromosomas en plantas de *F. x ananassa* obtenidas por estolones, hojas de callos *in vitro* y hojas de callos aclimatados en invernaderos, a pesar de que el contenido de ADN en pg fue mayor, lo que se puede deber a diferencias entre los cultivares en estudio (Brandizzi *et al.*, 2000).

9.4 Presencia de una posible *Fragaria vesca* en Chile.

La presencia de una accesión diploide en el estudio, puede deberse a la especie *F. vesca*, ya que esta presenta el mayor rango de distribución de manera natural, abarcando desde el oeste de los montes Urales, por todo el norte de Europa y en todo el sub-continente Norte americano, no obstante la especie se ha encontrado en Siberia, Kamchatka, Hokkaido, las islas Kuriles, las islas Aleutianas y el Archipiélago de Hawái, siendo introducida, de manera artificial en estas áreas (Hummer *et al.* 2011). Esta especie se caracteriza por tener hojas más delgadas, flores pequeñas y un fruto de intenso color rojo de menor tamaño, en comparación con *F. chiloensis* (Hummer *et al.* 2011). Para la confirmación del número de cromosomas de esta accesión, se pueden realizar estudios citológicos relacionados con la fijación y tinción de células del meristema apical de raíz en activa división mitótica, para su observación en microscopía confocal (Yanagi *et al.*, 2010; Hummer *et al.*, 2009), de esta manera se sabría de manera exacta el número de cromosomas. La caracterización morfológica de la especie no es recomendable debido a que varía con la edad, estación del año y condiciones ambientales (Degani *et al.*, 2001). Además, para la identificación de cultivares, se usan más de 15 caracteres distintos en la determinación de estos (Nielsen y Lovell, 2000), lo que conlleva a usar una mayor cantidad de material vegetal y tiempo. Para la determinación del origen, se pueden utilizar marcadores moleculares, los cuales son característicos de una especie e incluso de una población en particular. Estos se basan en secuencias del genoma, ADN, que se correlacionan con un fenotipo determinado (Cullis, 2004). Para el género *Fragaria* se han usado para determinar la diversidad y estructura genética de *F. x ananassa* (Degani *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2012; Ferreira-Nunes *et al.*, Van Dijk *et al.*, 2014) como también la estructura genética de *F. chiloensis* (Hinrichsen *et al.*, 1998)

X. Conclusiones.

La metodología usada en esta tesis permitió determinar de manera efectiva el contenido de ADN y nivel de ploidía en distintas accesiones de *F. chiloensis*, siendo en su gran mayoría octoploides, lo que sugiere que no existen variaciones ambientales, relacionadas con la distribución geográfica, que podrían afectar el nivel de ploidía y contenido de ADN.

El buffer y el fluorocromo usado en este estudio mostraron tener propiedades que los hacen útiles para estudiar los tamaños de genomas del género *Fragaria*, de manera rápida y precisa.

Este estudio es a la fecha el primero en determinar nivel de ploidía y contenido de ADN en una colección de genotipos nativos de *F. chiloensis* mediante el uso de citometría de flujo y el uso de ioduro de propidio como fluorocromo.

La técnica permitió identificar una accesión diploide, la que correspondería a *F. vesca*. Esta se trataría a la fecha del primer caso conocido de una especie diploide naturalizada en el hemisferio sur, lo que podría dar inicio a una serie de investigaciones para tratar de determinar cómo se originó y estableció en ese lugar.

XI. Referencias.

Ammirato P. V., (1983) Embryogenesis. En: Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., eds. Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding. New York: Mac Millan, pp: 82-123.

Arumuganathan K., Earle E. D., (1991) Nuclear DNA content of some important plant species, Plant Molecular Biology Reporter, 9:208-218.

Barker R. E., Kilgore J. A., Cook R. L., Garay A. E., Warnke S. E., (2001) Use of flow cytometry to determine ploidy level of ryegrass. Seed Science Technology, 29:493-502.

Brandizzi F., Forni C., Frattarelli A., Damiano C., (2001) comparative analysis of DNA nuclear content by flow cytometry on strawberry plants propagated via runners and regenerated from meristem and callus cultures. Plant Biosystems 135:169-174.

Bros R. H., (2000) A streamlined synthetic octoploid system that emphasizes *Fragaria vesca* as bridge species, National Library of Canada, 288 Pp.

Brown S., Renaudin J. P., Prevot C., Guern J., (1984) Flow cytometry and sorting of plant protoplasts-technical problems and physiological results from a study of pH and alkaloids in *Catharanthus roseus*. Physiologie Vegetable, 22:541-554.

Carrasco B., Garcés M., Rojas P., Saud G., Herrera R., Retamales J., Caligari P. D. S. (2007) The Chilean Strawberry [*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.]: Genetic Diversity and Structure. Journal American Society Horticulture Science. 132:501-506.

Chiatante D., Brusa P., Levi M., Sgorbati S., Sparvoli E. (1990) A simple protocol to purify fresh nuclei from milligram amounts of meristematic pea root tissue for biochemical and flow cytometry applications. Physiologia Plantarum, 78:501-506

Cires E., Cuesta C., (2012) Una herramienta eficaz en el estudio de la botánica: la citometría de flujo. Cuadernos de biodiversidad, 5:19-25

Contreras R., (2013) Cromosomas politénicos, La Guía Biología, URL: <http://biologia.laguia2000.com/genetica/cromosomas-politenicos>. Visto el 09 de enero de 2007.

Coate J. E., Luciano A. K., Seralathan V., Minchew K. J., Owens T. G., Doyle J. J., (2012) Anatomical, biochemical, and photosynthetic responses to recent allopolyploidy in *Glycine dolichocarpa* (Fabacea). American Journal of Botany, 99: 55-67.

Cronje M. J., Weir I. E., Bornmann L., (2004) Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry A*, 61:76-87.

Cullis C. (2004) *Plant genomics and proteomics*, Ed: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp: 125-140.

Cvikrová M., Binarová P., Cenková V., Eder J., Dolezel J., Machácková I., (2003) Effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on cell cycle progression in synchronous meristematic cells of *Vicia faba* roots. *Plant Science*, 164:823-832.

Dante R. A., Larkins B. A., Sabelli P. A., (2014) Cell cycle control and seed development. *Frontiers in Plant Science*, 5:1-14.

Darzynkiewicz Z., Halicka H. D., Zaho H., (2010) Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Advance Experimental Medical Biology*, 676:137-147.

Degani C., Rowland L. J., Saunders J. A., Hokanson S. C., Ogden E. L., Golan-Goldhirst A., Galletta G. J., (2001) A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLP, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica*, 117:1-12.

Dolezel J., Binarová P., Lucretti S., (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31: 113-120.

Dolezel J., Göhde W., (1995) Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, 19:103-106.

Dolezel J., Bartoš., (2005) Plant DNA Flow Cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110.

Dolezel J., Greilhuber J., Suda J., (2007) Flow cytometry with plants: An overview. En: Dolezel J., Greilhuber J., Suda J., eds. *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Weinheim: Wiley-VCH; pp 41-65

Dolezel J., Kubalaková M., Paux E., Dolezel J., Feuillet C., (2007) Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Research*, 15:51-66.

Finn C. E., Retamales J. B., Lobos G. A., Hancock J., (2013) The Chilean Strawberry (*Fragaria chiloensis*): Over 1000 Years of Domestication. *Horticulturae Science*, 48:418-421.

Galbraith D. W., Shields B.S., (1982) The effects of inhibitors of cell wall synthesis on tobacco protoplast development. *Physiologia Plantarum*, 55:25-30.

Galbraith, D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P., Firoozabady, E., (1983) Rapid flow cytophotometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049–1051.

Galbraith D. W., (1984) Flow cytometric analysis of the cell cycle in higher plants. En: Vasil I. K., ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plant*. New York; Academic Press, pp: 765–777.

Galbraith D. W., Lambert G. M., Macas J., Dolezel J., (1998) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. En: Robinson, J. P., Darzynkiewicz, Z., Dean, P. N, Dressler L. G., Orfao A., Rabinovitch P. S., Stewart C. C, Tanke, H. J., Wheelless L. L., eds. *Current protocols in cytometry*. New York: Ed: John Wiley & Sons, pp: 167–210.

Galbraith D., Lambert G. M., (2011) Using the BD Accuri® C6 Flow Cytometer for Rapid and Accurate Analysis of the Nuclear DNA Contents of Flowering Plants, BD Biosciences.

Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M., Hófte H., (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 114:295-305.

Graham M. J., Nickell C. D., Rayburn A. L., (1994) Relationship between genome size and maturity group in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 429–432.

Guimaraes A. G., Andrade Junior V. C., Pio L. A. S., Pasqual M., (2013) Estimativa da quantidade de DNA em morango. *Current agricultural science and technology*, 19:19-26.

Hancock, J.F., A. Lavin, and J.B. Retamales. (1999) Our southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. *Horticultural Science* 34:814– 816.

Harkins K. R., Galbraith D. W., (1984) Flow sorting and culture of plant protoplasts. *Physiologia Plantarum*. 60:43-52.

Heller F., O., (1973) DNA measurement of *Vicia faba* L. with the pulse cytophotometry. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 86:437-441.

Hinrichsen P., Kuncar J. C., Hirai M., Muñoz C., Lavín A., (1999) Diversidad genética en accesiones chilenas de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. Determinada mediante RAPDs (random amplified polymorphic DNA). *Agricultura Técnica (Chile)*. 59:151-168.

Hopping M. E., (1993) Preparation and preservation of nuclei from plant tissues for quantitative DNA analysis by flow cytometry. *New Zealand Journal of Botany*, 31:391-401.

Hummer E. K., Nathewet P., Yanagi T., (2009) Decaploidy in *Fragaria iturupensis* Studt (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 96:1-5.

Hummer E. K., Bassil N., Njuguna W., (2011) Chapter 2: *Fragaria* en C. Kole ed., *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits*, en: Kole C. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 247 pp.

Jedrzejczyk I., Sliwinska E., (2010) Leaves and seeds as materials for flow cytometric estimation of the genome size of 11 rosaceae woody species containing DNA-Staining Inhibitors. *Journal of Botany*, 20:1-9.

Kalendar R., Tanskanen J., Irnmonen S., Nevo E., Schulman A. H., (2000) Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 6603-6607.

Kausch A. P., Bruce B. D., (1994) Isolation and immobilization of various plastid subtypes by magnetic immunoabsorption. *Plant Journal*, 6:767-779.

Koné M., Patat-Ochatt E. M., Conreux C., Sangwan R. S., Ochatt S. J., (2007) In vitro morphogenesis from cotyledon and epicotyl explants and flow cytometry distinction between landraces of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) an under-utilised grain legume. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88:61-75.

Kondorosi E., Kondorosi A., (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase promoting complex during symbiotic cell development. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 567:152-157.

Loureiro J., Rodriguez E., Dolezel J., Santos C., (2006) Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98:679-689.

Lemontey C., Mousset-Déclas C., Munier-Jolain N., Boutin J. P., (2000) Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seeds. *Journal of Experimental Botany*, 51:167-175.

Lei X. Y., Liao X. D., Zhang G. Y., Dai Y. R., (2003) Flow cytometric evidence for hydroxyl radical induced apoptosis in tobacco protoplasts. *Acta Botanica Sinica*, 45:944-948.

Li L., Arumuganathan K., (2001) Physical mapping of 45S and 5S rDNA on maize metaphase and sorted chromosomes by FISH. *Hereditas*, 134:141-145.

Lionneton E., Beuret W., Delaitre C., Ochatt S., Rancillac M., (2001) Improved microspore culture and double haploid plant regeneration for the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Reports*, 20:126-130.

Michaelson M. J., Price H.J., Johnston J. S., Ellison J.R., (1991). Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 78: 1238–1243.

Marie D., Brown S. C., (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78: 41–51.

Muñoz M., (1980), *Flora del Parque Nacional Puyehue*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. Pp: 557.

Nehra N., Kartha K., Stushnoff C., (1990) Nuclear DNA content and isozyme variation in relation to morphogenic potential of strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus culture, *Canadian Journal of Botany*, 69:239-244.

Nielsen J. A., Lovell P. H., (2000) Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *New Zealand Journal Crop Horticultural Science*, 28:89–96.

Ferreira-Nunes C., Ferreira J. L., Leal A. L., Carvalho M. S., Pasqual M., Magela de Almeida G. C., (2013) The genetic diversity of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) hybrids based on ISSR markers. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35:443-452.

Ochatt S., Durieu P., Jacas L., Pontécaille C. (2001). Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass peas. *Lathyrus Neurolathyr Newslett*, 2:35-38.

Ochatt S. J., Muneaux E., Machado C., Jacas L., Pontécaille C., (2002) The hyperhydricity of invitro regenerants is linked with an abnormal DNA content in grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Journal of Plant Physiology*, 159:1021-1028.

Ochatt S. J., Marget P., Aubert G., Moussy F., Pontécaille C., Jacas L., (2004) Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives. *Euphytica*, 137:353-359.

Ochatt S. J, Delaitre C., Lionneton E., Huchette O., Patat-Ochatt E. M., Kahane R., (2005) One team, PCMV, and one approach, in vitro biotechnology, for one aim, the breeding of quality plants with a wide array of species. En: Dris R., ed. *Crops Growth, Quality and Biotechnology*. Wild Flower Library Public Science y Technology; 1038-1067.

Ochatt S. J., (2008), *Flow Cytometry in plant Breeding*, Cytometry part A, 73: 581-598.

Otto F. J., (1990), DAPI staining of fixed cells for high resolution flow cytometry of nuclear DNA, en Darzynkiewickz Z. Crissman H. A., eds. *Methods in Cell Biology*, Vol 33, San Diego Academics Press, pp: 105-110.

Ozaki Y., Narikiyo K., Fujita C., Okubo H., (2004) Ploidy variation of progenies from intraand inter-ploidy crosses with regard to trisomic production in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 17:157-164.

Pfossier M., Amon A., Lelley T., Heberle-Bors E., (1995) Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21:387-393.

Pirrello J., Bourdon M., Cheniclet C., Bourge M., Brown S. C., Renaudin J. P., Frangne N., Chevalier C., (2014). How fruit developmental biology make use of flow cytometry approaches. *Cytometry Part A*, 85:115-125.

Puite K. J., Ten Broeke W. R. R., (1983). DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplasts for flow cytometry with Hoechst 33342. *Plant Science Letters* 32: 79-88.

Petit P. X., Diolez P., Muller P., Brown S. C., (1986) Binding of concanavalin A to the outer membrane of potato tuber mitochondria detected by flow cytometry. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 196:65-70.

Petit P. X., (1992) Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria. *Plant Physiology*, 98:279-286.

Prosperi E., Giangare M.C., Bottiroli G., (1991), Nuclease induced DNA structural changes assessed by flow cytometry with the intercalating dye propidium iodide. *Cytometry* 12: 310-323.

Rayburn A.L., Auger J.A., Benzinger E. S., Hepburn A. G., (1989) Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *Journal of Experimental Botany* 40: 1179–1183.

Rayburn A. L., Auger J. A., McMurphy L. M., (1992), Estimating percentage constitutive heterochromatin by flow cytometry. *Experimental Cell Research* 198: 175–178.

Rayburn A. L., Biradar D. P., Bullock D. G., Nelson R. L., Gourmet C., Wetzel J. B., (1997) Nuclear DNA content diversity in Chinese soybean introductions. *Annals of Botany*, 80: 321–325.

Rho I. R., Hwang Y. J., Lee H. I., Lim K. B., Lee C. H., (2012) Interspecific hybridization of diploids octoploids in strawberry, *Scientia Horticulturae*, 134:46–52.

Roux N., Dolezel J., Swennen R., Zapata-Arias F. J., (2001) Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa spp*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66:189–197.

Roy A. T., Leggett G., Koutoulis A., (2001) In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reproduction*, 20:489–495.

Schroeder W. P., Petit P. X., (1992) Flow cytometry of spinach chloroplasts: Determination of intactness and lectin-binding properties of the envelope and the thylakoid membranes, *Plant Physiology*, 100:1092–1102.

Sakamoto K., Lida K., Koyano T., Asada Y., Furuya T., (1994) Method for selecting anthocyanin-producing cells by a cell sorter. *Planta Medica*, 60:253–259.

Sharma D. P., Firoozabady E., Ayres N. M., Galbraith D. W., (1983) Improvement of anther culture in *Nicotiana*: media, culture conditions and flow cytometric determination of ploidy levels. *International Journal of Plant Physiology*, 111:441–450.

Sesek P., Sustar-Vozlic J., Bohanec B., (2000) Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. *Europe Journal of Physiology*; 439 16–18

Staudt G., (2008) Strawberry biogeography, genetics and systematics. *Acta Horticulturae*, 824:71–83.

Sugimoto K., Williamson R. E., Wasteneys G. O., (2001) Wall architecture in the cellulose deficient *rsw1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: Microfibrils but not microtubules

lose their transverse alignment before microfibrils become 35atagónica35ble in the mitotic and elongation zones of roots. *Protoplasma*, 215:172-183.

Ulrich I., Fritz B., Ulrich W.. (1988), Application of DNA fluorochromes for flow cytometric DNA analysis of plant protoplast. *Plant Science* 55: 151–158.

Upton G., Cook I., (2006) A dictionary of statistics, 2ed. Oxford University Press, 512 pp.

Yanagi, T., Hummer, K.E., Iwata, T., Sone, K., Nathewet, P., Takamura, T., (2010). Aneuploid strawberry was developed from homozygous unreduced gamete produced by second division restitution in pollen. *Scientia Horticulture*, 125:123–128.

Yanpaisan W., King N. J. C., Doran P. M., (1999) Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. *Biotechnology Advance*, 17:3-27.

Yoon M. Y., Moe K. T., Kim D. Y., Rho I. R., Kim S., Kim K. T., Won M. K., Chung J. W. Park Y. J., (2012) Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using SSR markers. *Electronic journal of Biotechnology*, 15:1-16.

Van Dijk T., Pagliarani G., Pikunova A., Noordijk Y., Yilmaz-Temel H., Meulenbroek B., Visser R. G. F., Van de Weg., (2014) Genomic rearrangements and signatures of breeding in the allo-octoploid strawberry as revealed through an allele dose based SSR linkage map. *Bio Medical Center Plant Biology*, 55:1-16.

Van Duren M., Morpurgo R., Dolezel J., Afza R, (1996) Induction and verification of autotetraploids and diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica*, 88:25-34.

Weber J., Georgiev V., Pavlov A., Bley., (2008) Flow cytometric investigations of diploid and tetraploid plants and in vitro cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*, *Cytometry Part A*, 73:931-939.

XII. Anexo

Tabla 1: Listado con las distintas accesiones de *Fragaria chiloensis*. Usadas en esta tesis. Su nombre completo, localización y además de su ubicación geográfica.

Número de accesión	Código	Nombre de la Accesión	Localidad	Ubicación geográfica
9	ALE	Alerce	Parque Nacional Alerce Costero	39°53'7.63"S 73°27'24.03"O
-	ARO	<i>F. ananassa</i> cv. Aromas*	-	-
33	CAU	Caulín	Chiloé	41°47'53.8"S 73°39'36.4" O
21	CAU-2	Caulín 2	Chiloé	41°47'49.7"S 73°39'45" O
20	CHA	Chanco	Cauquenes	35°44'23.04"S 72°30'58.01"O
18	CHI	Chillán	Las Trancas, Chillán	36°54'38.57"S 71°28'35.24"O
19	CHI-2	Chillán	Termas de Chillán.	36°55'4.69"S 71°25'59.26"O
31	CHL	Chaiguao	Chiloé	43°07'58.9"S 73°30'25.1"O
44	CNT	Contulmo	Contulmo	36°43'43.4 S 72°54'07.6 O
34	CNT2	Contulmo	Contulmo	36°43'50.4 S 72°56'07.6 O
56	COC	Cochamó	Cochamó, Llanquihue, Los Lagos	41°30'9.84"S 72°15'54.01"O
22	COL-2	Colún 2	Chaihuín	40°04'57.5"S 73°38'50.1"O
22	COL-3	Colún 3	Chaihuín	40°04'57.5"S 73°38'50.1"O
39	CRC	Curacautín	Curacautín	38°26'5.63"S 71°51'26.53"O
29	CUC	Cucao	Chiloé	42°35'50.3"S 74°07'26.8"O
30	CUC-2	Cucao 2	Chiloé	42°36'27.6"S 74°07'03.2"O
38	CXM	Hibrido entre	Contulmo y Manzanar	-
32	GUT	Cuesta Gutierrez	Camino a Río Negro, Pto. Varas	41°19'58.1"S 73°17'40.6" O
52	HUA	Huaro	Rafael, Tomé, BioBio	36°36'3.70"S 72°43'28.33"O

Tabla 1: continuación.

Número de accesión	Código	Nombre de la Accesión	Localidad	Ubicación geográfica
25	HUE	Huerquehue	Pucón	39°10'01.3"S 71°43'22.7"O
26	HUE-2	Huerquehue 2	Pucón	39°10'02.7"S 71°43'05"O
27	HUE-3	Huerquehue 3	Pucón	39°10'19.5"S 71°42'43.5"O
28	HUE-4	Huerquehue 4	Pucón	39°10'30"S 71°42'42.8"O
10	LIC	Lican-Ray	C. de los Andes, a 6 km de Lican-Ray	39°29'58.42"S 72°13'53.66"O
15	LIN	Linalhue	Zona de Linalhue, Lago Ranco	40°17'46.80"S 72°10'12.58"O
41	LIR	Lircay	Parque Alto Lircay	35°36'17.2"S 71°03'51.8" O
35	LLE	Lleuque	Lleuque	36° 52' 04.6"S 71°30' 53.2"O
40	LLE-2	Lleuque	Lleuque	39°57'50"S 73°39'36"O
23	LOB	Lobos	Chaihuín	39°57'50"S 73°39'36"O
7	MAH	Mamuil-Mamal	Paso Fronterizo Mamuil-Malal (Pucón)	39°32'42.9"S 71°33'13.5"O
5	MAL	Malalcahuello	C. de los Ándes, Sector Malalcahuello	38°29'39.96"S 71°35'10.52"O
1	MAN	Manzanar	Cordillera de Nahuelbuta	38°2'30.24"S 73° 8'38.44"O
50	MAÑ	Mañihuales	Mañihuales, Coyhaique,	45° 9'49"S 72° 7'21"O
51	MAÑ-2	Mañihuales 2	Mañihuales, Aysén	45°13'20"S 72°12'52"O
53	MAR	Mar Brava	Caremapu, Maullín.	41° 08' 27.8"S 73° 44'04.6" O
42	MEN	Menetue	Menetue, Pucón	39°19'50.91"S 71°43'11.49"O
6	MOL	Molinos	C. de la Costa, Sector Los Molinos, Valdivia	39°47'0.85"S 73°23'20.90"O
2	NAH	Nahuelbuta	Parque Nacional Nahuelbuta	37°46'21.02"S 72°56'43.14"O

Tabla 1: continuación.

Número de accesión	Código	Nombre de la Accesión	Localidad	Ubicación geográfica
3	NAH-2	Nahuelbuta 2	Cordillera de Nahuelbuta	38° 2'4.82"S 73° 8'52.09"O
4	NAH-3	Nahuelbuta 3	Cordillera de Nahuelbuta	38° 1'53.26"S 73°8'37.27"O
58	NEL	Neltume	Neltume, Panguipulli, Los Ríos	39°47'43.12"S 71°55'38.83"O
55	PET	Petrohué	Salto del Petrohué, Puerto Varas, Los Lagos	41° 08' 17.5" S 72° 24' 08.3" O
24	PFA	Pta. Falsa	Chaihuín	39°58'08.7"S 73°40'04.3"O
43	PFA-2	Pta. Falsa	Chaihuín	39°58'08.7"S 73°40'04.3"O
54	PIN	Pinuno	Pta Falsa, Chaihuín, Los Ríos	39°58'08.7"S 73°40'04.3"O
8	PUN	Punucapa	C. de la Costa, Sector Punucapa, Valdivia	39°46'4.18"S 73°16'27.84"O
11	QUE	Queule	Localidad de Queule, Nueva Tolten	39°23'53.82"S 73°12'21.42"O
45	RAN	Ranchillo	Ranchillo Alto	37° 4'57.41"S 71°39'1.86"O
46	RAN-2	Ranchillo-2	Ranchillo Alto	35° 05' 32.7" S 72°03'41" O
47	RAN-3	Ranchillo-3	Ranchillo Alto	37°04'49.1"O 71°39'21.9" O
12	SAV	Saval	Saval, valdivia	39°48'13.48"S 73°15'22.14"O
37	TRA	Trancas	Las Trancas	36° 54'33.1" S 71°30'52.5" O
17	TST	3 Esteros	Osorno	40°45'30.10"S 73°17'19.90"O
13	VAL	Valdivia	Feria de la ciudad de Valdivia	-
16	VAL-2	Valdivia 2	Valdivia	39°52'28.00"S 73°10'52.15"O
-	VES	<i>F. Vesca</i> var. Hawaii*	-	-

* Especies utilizadas como controles en el estudio.

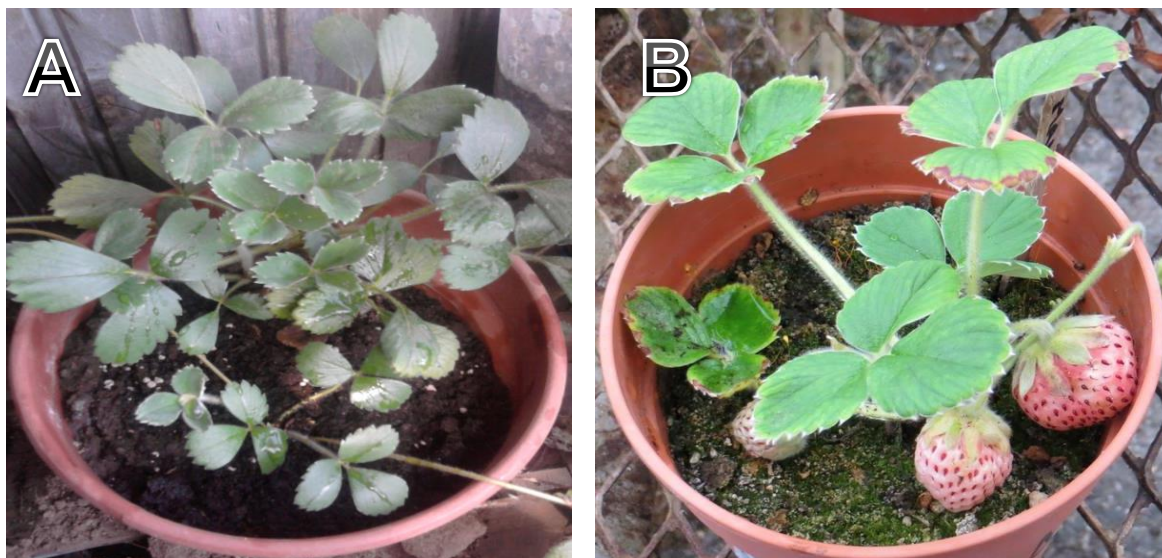


Figura 1: Aspecto morfológico general de *Fragaria chiloensis* en sus dos formas botánicas, A: *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis* f. *patagónica* B: *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis* f. *chiloensis*,



Figura 2: Aspecto morfológico general de *F. vesca* var. *Hawaii*, especie usada como control diploide para este estudio.



Figura 3: Aspecto morfológico general de *Fragaria x ananassa* cv. Aromas, especie usada como control octoploide para este estudio.



Figura 4: Aspecto morfológico general de *H. vulgare*, especie usada como control para el cálculo del contenido de ADN en este estudio.



Figura 5:Aspecto morfológico general de *A. thaliana*, especie usada como control para los distintos buffers usados en este estudio.

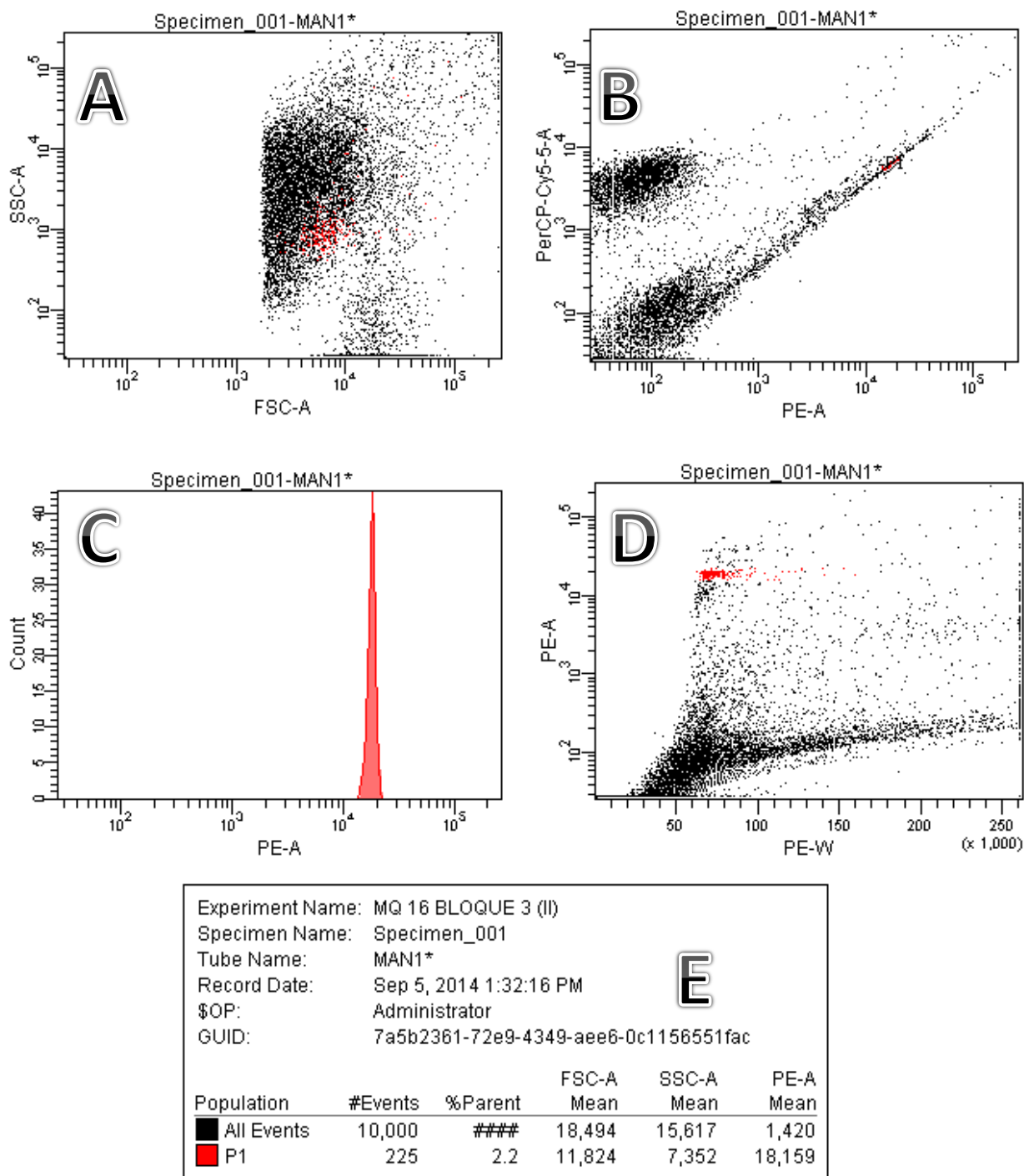


Figura 6: Resultados entregados por el programa FACS DIVA 6.0, A: en las ordenadas la granulosidad del núcleo, en las abscisas el tamaño (SSC vs FSC), B: intensidad de fluorescencia de dos fluorocromos, C: En el eje de las abscisas se muestra la intensidad de la fluorescencia, en el eje de las ordenadas el número de núcleos, D: intensidad de fluorescencia del PI, E: Resumen y promedios de los datos.

XIII. Apéndice.

13.1 Test de Dunnett.

Es un procedimiento de comparación múltiple desarrollado por el Estadista canadiense Charles Dunnett, para comparar un número de tratamientos con un solo control, esta se realiza mediante el cálculo estadístico de la *t* de Student, para cada experimento o tratamiento agrupado, comparándose estadísticamente contra un solo control experimental o tratamiento. Como cada comparación tiene el mismo control, la metodología incorpora la dependencia entre estas comparaciones. Los *t*-estadísticos, derivan de la misma estimación de la varianza del error obtenido mediante la agrupación de las sumas de cuadrados del error para todos los tratamientos o grupos (control y tratamientos) (Upton y Cook, 2006)

13.2 Fluorocromos usados en citometría de flujo.

Existe una amplia gama de fluorocromos que se unen específicamente al ADN pero solamente unos pocos son adecuados para la cuantificación del contenido de ADN en plantas, en la tabla 1 se puede observar un resumen de sus características. (Cires y Cuesta, 2012)

Tabla 1: Características básicas de los principales fluorocromos de ADN utilizados en el análisis de citometría de flujo de plantas.

Fluorocromo	Modo de unión	Concentración (µg mL ⁻¹)	L. O. excitación (nm)	L. O. emisión (nm)
Bromuro de etidio	intercalante	50-150.	523	603
Yoduro de propidio	intercalante	50-150.	538	617
4', 6-diamino-2-fenilindol	AT-selectivo	2-4.	359	461
Hoechst 33258	AT-selectivo	2-4.	352	455
Mitramicina	GC-selectivo	50-100.	445	575