



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD - FRUTICULTURA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SELECCIÓN DE LINEAS AVANZADAS DE
FRESA”**

MARTÍN AGUILAR TLATELPA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD - FRUTICULTURA

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO 2016

La presente tesis titulada: “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SELECCIÓN DE LINEAS AVANZADAS DE FRESA**”, realizada por el alumno **Martín Aguilar Tlatelpa**, bajo la dirección del Consejo Particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD -
FRUTICULTURA**

CONSEJO PARTICULAR

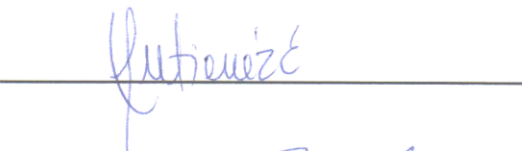
CONSEJERO:

Dr. Guillermo Calderón Zavala



ASESOR:

Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa



ASESOR:

Dr. Ricardo Lobato Ortiz



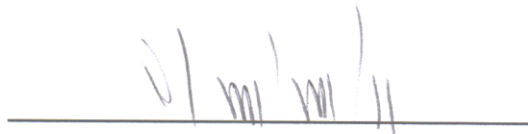
ASESOR:

Dr. Leobigildo Córdoba Téllez



ASESOR:

Dr. Víctor Volke Haller



Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados en el postgrado de Recursos Genéticos y Productividad – Fruticultura, por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente proyecto.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme financiamiento en mis estudios.

Al Dr. Guillermo Calderón Zavala, por brindar los todos los recursos, las herramientas y asesorías requeridas, para el desarrollo de la presente tesis.

A los profesores miembros de mi consejo, por los consejos y asesorías, que pudieron brindarme, en especial a la Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa.

Al Dr. Amalio Santa Cruz Varela, quien amablemente otorgo los recursos tecnológicos para la ejecución del análisis molecular, mediante el uso del laboratorio, junto a la laboratorista Sra. Laura Carrillo, por su tiempo y amistad otorgada.

A todas aquellas personas que de forma desinteresada colaboraron en la realización de alguna etapa del presente proyecto

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mi padre y mi madre, los profesores Gregorio Aguilar y Mirella Tlatelpa, gracias por su apoyo aún en los momentos más difíciles.

Para Martin y Liza Mireya,
a quienes expreso todo mi amor.

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SELECCIÓN DE LINEAS AVANZADAS DE FRESA”

CONTENIDO

RESUMEN	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA	5
ASPECTOS GENERALES SOBRE LA FRESA	5
Importancia	5
Anatomía y morfología	6
MÉTODOS DE MEJORAMIENTO EMPLEADOS EN EL CULTIVO DE LA FRESA	10
El mejoramiento genético	10
El mejoramiento genético en la fresa	12
Mejoramiento genético tradicional	15
Mejoramiento enfocado a calidad del fruto	21
Mejoramiento enfocado a los hábitos de floración	23
Mejoramiento enfocado a resistencia de enfermedades	25
HERRAMIENTAS MOLECULARES EN EL CULTIVO DE LA FRESA	26
Resistencia a enfermedades	28
Fotoperiodo	29
Esterilidad masculina y femenina	30
Composición genómica de la fresa	30
Identificación del germoplasma	31
BIBLIOGRAFÍA	34
CAPÍTULO II: HUELLA GENÉTICA DE LAS VARIEDADES DE FRESA OBTENIDAS EN EL COLEGIO DE POSTGRADUADOS	38
RESUMEN	38
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45

CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	56
CAPÍTULO III: SELECCIÓN DE LÍNEAS AVANZADAS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE FRESA EN EL COLEGIO DE POSTGRADUADOS	60
RESUMEN	60
INTRODUCCIÓN	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
Primer año de evaluación	64
Segundo año de evaluación	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
Primer año de evaluación	66
Segundo año de evaluación	70
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	75
CAPÍTULO IV: APTITUD COMBINATORIA DE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL RENDIMIENTO DE FRUTO EN FRESA, A PARTIR DE UN DISEÑO DIALÉLICO	77
RESUMEN	77
INTRODUCCIÓN	78
MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
Análisis de varianza	82
Aptitud combinatoria general (ACG).....	83
Aptitud combinatoria específica (ACE)	84
Componentes de ACG, ACE y heredabilidad	85
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Prueba de amplificación de PCR del marcador EMFn111 en función de la calidad de DNA expresada en densidad óptica relación 260/280 ($DO_{260/280}$). Electroferograma elaborado con el programa GeneMapper®. a) $DO_{260/280}$; b) 1.4 $DO_{260/280}$; c) 1.8 $DO_{260/280}$ 48
- Figura 2. Comparativos entre patrón alélico de las variedades Festival mantenida en el Colegio de Postgraduados y la mantenida en Florida según Brunings et al, (2010). Gráficas obtenidas mediante R..... 50
- Figura 3. Fenogramas generados a partir de datos moleculares (SSR), resultados obtenidos del cálculo de matrices de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice (izquierda) y de Jacard (derecha)..... 52
- Figura 4. Geles virtuales elaborados a partir de los patrones alélicos de las accesiones evaluadas. Usando R v.3.1.2..... 53
- Figura 5. Puntos de dispersión de los componentes principales Fres 1 (productividad) y Fres 2 (peso de fruto), en el primer año de selección individual en fresa. 68
- Figura 6. Dispersión de los componentes principales Fres1 (productividad) y Fres3 (estolonización), en el primer año de selección individual en fresa. 69
- Figura 7. Dispersión de los valores lineales obtenidas por los componentes principales Fresa1 (productividad) y Fresa2 (estolonización), en el ciclo de selección 2014-2015. 73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de ADN y densidad óptica de tres metodologías de extracción.	46
Cuadro 2 . Temperaturas de amplificación, picos observados y tamaño de los fragmentos hallados en el presente estudio en comparación con estudios previos.	49
Cuadro 3 . Número de alelos observados considerando todos los marcadores usados en las cinco accesiones evaluadas	51
Cuadro 4 . Estimadores poblacionales de las variedades de fresa evaluadas	54
Cuadro 5. Cruzas de fresa evaluadas, durante el presente estudio	65
Cuadro 6. Matriz de correlaciones para las variables estolones, número de frutos, peso de fruto y rendimiento.....	67
Cuadro 7. Componentes principales obtenidos durante el análisis.....	67
Cuadro 8. Plantas de fresa seleccionadas mediante análisis de componentes principales durante el primer ciclo de selección 2013-2014	70
Cuadro 9. Matriz de correlaciones para las variables tomadas en el segundo año de evaluación, ciclo 2014-2015	71
Cuadro 10. Componentes principales obtenidos durante el análisis del ciclo de selección 2014-2015.....	71
Cuadro 11. Plantas de fresa seleccionadas durante el ciclo 2015-2016.....	74
Cuadro 12.. Diseño de cruzamientos dialélico según el método 2 de Griffing, y los progenitores de fresa usados, donde: $[p(p+1)/2]$	81

Cuadro 13. Relación ACG/ACE, para tres caracteres asociados a rendimiento en Fresa..... 83

Cuadro 14. Efectos de aptitud combinatoria general (ACG) en tres caracteres asociados al rendimiento en fresa 84

Cuadro 15. Efectos de la aptitud combinatoria específica (ACE) para componentes de rendimiento en fresa..... 85

Cuadro 16. Componentes de ACG, ACE y Heredabilidad para tres caracteres en fresa..... 86

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SELECCIÓN DE LINEAS AVANZADAS DE FRESA

D.R. Martín Aguilar Tlatelpa
Colegio de Postgraduados 2016

RESUMEN

La fresa es un fruto muypreciado alrededor del mundo por sus propiedades benéficas para la salud, pero sobre todo debido a su sabor agradable y vistosidad. Sin embargo, la producción de este fruto requiere de grandes esfuerzos, y que se inician con el desarrollo de las variedades que los productores demandan y que deben estar adecuadas a las condiciones ambientales de la zona de cultivo. Dado que la fresa es una planta con poca plasticidad fenotípica, es necesario desarrollar variedades idóneas para cada región cultivada. El Colegio de Postgraduados, ha tenido un pequeño programa de mejoramiento genético en frutales, donde se ha incluido a la fresa, y se han desarrollado variedades como Jacona, Zamorana y CPLE7, que, seleccionadas bajo condiciones adversas de nutrición y clima, les han conferido rusticidad, dándoles un nivel mayor de plasticidad fenotípica. Como una pequeña contribución a los esfuerzos de mejora en el cultivo, en la presente investigación se presenta una metodología para caracterizar molecularmente a partir de microsatélites SSR`s, a las variedades de fresa, con fines de identificación y determinación de la calidad genética en viveros. También se presenta una metodología de selección mediante el uso de componentes principales, donde mediante selección individual en dos ciclos distintos de evaluación, primero en el ciclo 2013 – 2014, donde se desarrollaron 23 selecciones avanzadas, y después en el ciclo 2014-2015, donde a partir de las poblaciones F2 de las selecciones 2013-2014, se logró seleccionar un total de 70 genotipos sobresalientes en cuanto a productividad de fruto.

Palabras Clave: Caracterización molecular; *Fragaria x ananassa*; selección individual; dialélico.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND STRAWBERRY BREEDING IN ADVANCED SELECTIONS LINES

D.R. MARTIN AGUILAR TLATELPA

Colegio de Postgraduados 2016

SUMMARY

The strawberry is a very popular fruit around the world, because it has high nutritional properties but especially because the fruit is delicious, colorful and aromatic. However, the strawberry crop requires high human efforts and material inputs. These efforts starts with the developed of strawberry varieties that the growers look for and the varieties should be adapted to the crop production environmental conditions. It is known that the strawberry has a low phenotypic plasticity, for that reason is necessary develop varieties for each one of the strawberry production zones. The Colegio de Postgraduados has a small fruit breeding program where it has been included the strawberry; in this program have been developed strawberry varieties under poor environmental conditions as Jacona, Zamorana and CPLE7. Like a contribution to enhance the breeding strategies in strawberry breeding program of Colegio de Postgraduados, in this thesis is presented a methodology for strawberry molecular characterization from microsatellites SSR's with the goal of varietal identification. Also is presented a methodology for strawberry individual selection with the principal component analysis strategy (PCA), in two selection cycles 2013-2014 and 2014-2015, where they were selected 23 advanced selections in the first cycle and 70 outstanding genotypes in the second cycle. Finally, it was obtained the general and specific combinatory ability of advanced strawberry selections under a 7x7 diallelic design, with the aim of finding the best progeny of the parental.

Key words: Molecular characterization; *Fragaria x ananassa*; individual selection; diallelic design.

INTRODUCCIÓN

La fresa cultivada (*Fragaria x ananassa*) ($2n = 8x=56$), es un cultivo de alto valor comercial en muchas regiones templadas y subtropicales del mundo. Por tal motivo se han creado más de 100 programas de mejoramiento, con el objetivo de desarrollar variedades superiores en diferentes características, como sabor, textura, contenido de anti-oxidantes, mayor tiempo de cosecha y sobre todo una mayor vida post-cosecha (Govan et al. 2008).

En México existen algunos programas de mejoramiento de esta especie, donde destacan los creados por el Colegio de Postgraduados, el CINVESTAV e INIFAP, de los cuales el de mayor relevancia es el primero, creando las variedades Jaconá, Zamorana y CPLE7, cuya producción comercial de planta y fruto es un hecho dentro de la zona productora de fresa en los estados de Michoacán y Guanajuato.

En todo el mundo se hacen esfuerzos para hallar una forma fácil y segura para identificar las diferentes variedades de fresa, debido a que se propaga por vía vegetativa mediante estolones y se considera un reto mantener la integridad de las variedades más importantes. El fenotipo de la planta de fresa es extremadamente plástico y puede ser una tarea difícil distinguir entre variedades solo por características vegetativas y dado la naturaleza invasiva de los estolones, se pueden mezclar entre selecciones de planta elite, si se cultivan muy cercanamente, acarreando grandes pérdidas si se confunden los materiales plantados.

Al ser una especie de alto valor económico las variedades poseen un registro, que brinda un título de obtentor sobre los materiales más importantes, por tanto, se requiere pagar regalías por cada planta que se propaga o se destina a la producción de fruto.

En la actualidad se han probado un gran número de herramientas moleculares para tratar de caracterizar la huella genética de los materiales de fresa como es el caso de los AFLP's, RAPD's e ISSR's, pero todos estos han tenido problemas de repetitividad o dificultad en su implementación. Mientras que los microsatélites presentan co-dominancia, los RAPD (cuya repetitividad depende de las condiciones de la reacción) y AFLP que son dominantes. Por otro lado, los micro satélites (SSR's) o Simple Secuence Repeats, son identificadores genotípicos confiables, robustos y consistentes, además se han usado para un gran número de cultivos, incluyendo a poliploides. Estos marcadores son confiables para la detección de poli nucleótidos repetidos que exhiben gran variación, incluso entre accesiones fuertemente relacionadas, tienen habilidad para distinguir polimorfismos sutiles y son reproducibles. Los SSR son especialmente útiles en la fresa cultivada ya que la especie tiene un genoma octaploide y presenta ocho variantes alélicas para cada locus (Ashley et al. 2003).

En este contexto, Brunings et al. (2010), realizaron un ensayo con el objetivo de comparar una serie de variedades y selecciones avanzadas de fresa del Programa de Mejoramiento de la Universidad de Florida, donde se utilizó un set de 10 primers de marcadores SSR caracterizados por Govan et al. (2008) y que muestran patrones complejos que cambian en gran medida entre variedades.

Por otra parte, los marcadores del tipo SSR tienen aplicaciones en la evaluación de germoplasma, estudios de diversidad genética, mapeo, estudios de filogenia y estudios de evolución. Con la ventaja de ser co-dominantes, requiere muy poco DNA, no requieren de ADN de alta calidad, son altamente polimórficos, están uniformemente distribuidos a través del genoma, la interpretación de resultados es simple, son de fácil automatización, de alta reproducibilidad. Situación que los hace idóneos para la caracterización varietal.

Sin embargo y a pesar de todos los avances en el campo de la biología molecular, es necesario acudir a las técnicas de mejoramiento genético convencional para desarrollo de variedades de fresa con buenas características de productividad, hace necesario incursionar en el proceso de cruce y selección de materiales sobresalientes, de esta manera existen muchos programas de mejoramiento en el cultivo alrededor del mundo. La principal razón de esto es la pobre plasticidad fenotípica que expresa el cultivo de la fresa, ya que existe una importante interacción entre el genotipo y el ambiente donde se desarrolla, (Alm *et al.* 2007; Bradford *et al.* 2010). Lo anterior aunado a la preferencia de los consumidores, las exigencias de la industria, el mercado y los mismos productores, hacen que la dinámica de generación de variedades sea muy activa, tanto en el sector público como privado, (Lezzoni *et al.* 2010).

De entre los caracteres más importantes durante el proceso de mejora de la fresa se encuentran: el tamaño y número de frutos, la estolonización, color externo e interno, uniformidad de la producción. Cuando se desean mejorar características organolépticas a las selecciones avanzadas del programa, se evalúan caracteres como: el contenido de sólidos solubles, la acidez titulable, azúcares individuales y compuestos volátiles, (Whitaker *et al.*, 2011). La mayoría de los programas de mejoramiento se basan en esquemas de apareamiento recombinante complementario, para tomar ventaja de los efectos no aditivos y de la actitud combinatoria específica, para después hacer selección en la progenie de cada cruce dirigida (Faedi *et al.*, 2002).

Con resultados de análisis de correlación se ha determinado que durante el proceso de selección y con la finalidad de incrementar el tamaño del fruto, en un programa de mejoramiento genético, se debe poner mayor atención a los siguientes caracteres:

número de hojas, número de estolones por planta y número de frutos por planta, ya que estos tienen efectos positivos sobre los componentes de rendimiento de la fresa, (Ara *et al.*, 2009).

Existen varias técnicas para discriminar la información morfológica colectada en campo y relacionarla con los efectos del ambiente o encontrar diferencias entre los caracteres medidos, las que son: el enfoque de regresión lineal y los relacionados con parámetros de estabilidad (análisis de conglomerados, análisis de componentes principales, métodos geométricos y dominancia estocástica) (Westcott, 1986); el análisis de componentes principales es considerado equivalente al método de regresión lineal, ya que la estimación de los mínimos cuadrados es equivalente a obtener los componentes principales de los datos colectados, y se pueden dividir los genotipos en dos grupos, aquellos que muestren correlación positivas y aquellos que tengan correlaciones negativas con cada uno.

En el presente trabajo se estandarizó y se desarrolló una metodología para caracterizar molecularmente a las variedades de fresa del Colegio de Postgraduados, usando la técnica de PCR y visualizando los resultados vía electroforesis capilar. Además, se evaluaron cruza de fresa entre progenitores élite, se obtuvo la población F2 de las selecciones de primer año para su evaluación, bajo el enfoque de componentes principales. También se evaluó un diseño de cruza dialélicas bajo el segundo método de Griffing, entre progenitores sobresalientes para evaluar su aptitud combinatoria general (ACG), específica (ACE) y parámetros de heredabilidad, de caracteres asociados

CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

ASPECTOS GENERALES SOBRE LA FRESA

Importancia

El fruto de la fresa es uno de los alimentos más importantes en el mundo, la producción global de este es de más del doble en comparación con la producción de las otras frutillas combinadas, (Stewart, 2012). El cultivo de la fresa es posible en casi todos los países del mundo. Aunque en la mayoría de los países la producción se efectúa a pequeña escala, con pocos insumos, bajos rendimientos y para su venta en mercados locales. Este producto es muy apreciado en los países desarrollados, y es en estos donde su consumo es muy generalizado; los principales importadores son Estados Unidos de América, Canadá, Alemania, Francia y Rusia, mientras que los principales exportadores en orden de importancia son: España, Estados Unidos de América, México, Bélgica e Italia (FAOSTAT, 2016).

En México se cultiva de manera intensiva en Michoacán, Baja California, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, que son los que poseen la mayor superficie sembrada, con rendimientos promedios de 46 ton. ha⁻¹, y un valor de la producción a nivel nacional de \$ 5 472 457 800.00 pesos Mx, (SIAP, 2014). Sin embargo, aún existen muchas unidades de producción a pequeña escala, mismas que usan pocos insumos agrícolas, con baja productividad y por tanto baja rentabilidad. A pesar de estas circunstancias la producción y cultivo en México ha crecido como menciona Stewart, (2012), nuestro país ha pasado de ocupar el octavo lugar en 2007 al tercero en cuanto a exportaciones se refiere.

La gran aceptación del fruto por parte de los consumidores, es en primer lugar gracias al buen sabor del producto, y después gracias a sus potenciales beneficios en la salud por su alto contenido en vitamina C, folato, magnesio, compuestos fenólicos, antocianinas, taninos hidrosolubles y ácidos fenólicos, estos últimos junto a la vitamina C se consideran como compuestos con alta eficiencia antioxidantes, (Liston *et al.*, 2014).

En segundo término, se tienen los precios altos de venta que alcanza el fruto, como lo mencionan las estadísticas de FAOSTAT (2014), que en México el precio de la fresa alcanza los US\$ 897.73 ton, lo que equivale a \$16 792.00 (MN). ton⁻¹; estos factores hacen que el cultivo sea atractivo, tanto para el sector empresarial como para los productores agrícolas de menor tamaño. Tan solo México siembra anualmente una superficie de 9 967 ha, considerando a todos los estados productores, con un precio medio rural de \$ 11 923.00 (MN). ton⁻¹ (SIAP, 2014).

Sin embargo, aún faltan muchos retos por vencer en cuanto a la mejora de la eficiencia de los sistemas de producción predominantes en nuestro país, sobre todo en lo referente al uso del agua, los fertilizantes, manejo del suelo, obtención de variedades resistentes a los diversos patógenos que atacan al cultivo, y adaptadas a las condiciones predominantes de cada microclima de las zonas productoras del país.

Anatomía y morfología

Según Bonet, G. 2010, la planta de fresa pertenece a la familia Rosacea, donde se encuentran muchas especie (3000) de importancia económica, siendo esta una de las familias de mayor importancia del mundo. La fresa es una planta dicotiledónea cuya clasificación sistemática es:

- Reino: Plantae
- Subreino: Embryobionta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Superorden: Rosanae
- Orden: Rosales
- Familia: Rosaceae
- Subfamilia: Rosoideae
- Tribu: Potentilleae
- Subtribu: Fragariinae
- Género: *Fragaria*

Dentro de este género se localizan alrededor de 25 especies, agrupadas en cuatro grupos de fertilidad, asociados con su nivel de ploidía o número de cromosomas. La especie silvestre más común es *F. vesca* que tiene 14 cromosomas y se considera, como diploide; sin embargo, la planta con mayor importancia económica es *Fragaria x ananassa*, misma que es octaploide, por tanto, posee 56 cromosomas. Esta fresa cultivada resultó del cruce de dos especies octaploide silvestres de origen americano *fragaria chiloenis* (L.) Duch., y *Fragaria virginiana* Duch.; aunque también existen especies tetraploides, hexaploides de origen silvestre (Hancock *et al.*, 1991).

La fresa diploide ha sido una de las plantas más estudiada del grupo de frutales al que pertenece, sobre todo en aspectos como la regulación de la floración e interacciones de

la planta con el ambiente. Sin embargo, la fresa cultivada es de naturaleza octaploide situación que dificulta tomarla como modelo de estudios genéticos.

Según Hancock (1999), la fresa es una planta herbácea y perenne que tiene un tallo central llamado comúnmente corona, a partir del cual surgen órganos como las hojas, raíces, estolones, inflorescencia e incluso las raíces. La corona consiste en un núcleo central rodeado de anillos vasculares y compuesto básicamente por médula, con una capa de cambium rodeándola. En cada axila de las hojas se encuentra una “yema axilar”, mismas que pueden producir estolones, inflorescencias o permanecer latentes, en función de las condiciones ambientales. Las hojas son trifoliadas y están arregladas en espiral, en donde en un intervalo de cada seis hojas, la primera se posiciona exactamente debajo de la sexta. Estas hojas tienen la típica conformación de las dicotiledóneas desde la epidermis, el tejido en empalizada y las capas del mesófilo. Sólo presentan estomas en el envés de la hoja. En la mayoría de las especies las hojas solo viven unos cuantos meses y mueren cuando son expuestas a temperaturas bajas, aunque algunas hojas pueden seguir verdes incluso en invierno, pero mueren cuando las temperaturas bajan de cero grados centígrados. Cuando las temperaturas son cálidas emergen nuevas hojas que pasaron el invierno en forma de primordios protegidas por las estípulas.

Las raíces emergen de la base de la corona a partir de donde entran en contacto con el suelo; la anatomía de este órgano es típico de las dicotiledóneas, de donde, a partir del periciclo se originan raíces adventicias que empujan a través del córtex, comienzan a ramificar cuando alcanzan una longitud de 2 a 5 cm y a partir de este punto, continúan ramificado hasta convertirse en una masa fibrosa. Se considera, que del 50 al 90% de

las raíces se concentran dentro de los primeros 10 a 15 cm de profundidad. Los estolones de la mayoría de las plantas están compuestos por dos nodos, en donde la planta hija se localiza en el segundo nodo, mientras el primer nodo permanece latente o puede originar un estolón de menor tamaño. Cada planta hija tiene la capacidad de producir su propio estolón. La planta de fresa cultivada puede producir de 10 a 15 estolones por año, mientras que una planta silvestre puede duplicar esa cantidad.

Las inflorescencias de la fresa es un tallo modificado o cima, que termina con una flor terminal, y por debajo de ésta, por lo regular se encuentran dos flores secundarias, cuatro terciarias y ocho cuaternarias. Una flor típica tiene diez sépalos, cinco pétalos, de 20 a 30 estambres y de 60 a 600 gineceos, el número varía en función de la posición de la flor. En la actualidad existen algunas variedades que emiten solo flores primarias, eliminando las secundarias y demás niveles. El polen madura antes de que las anteras abran, pero no es dehiscente hasta la apertura floral, permanece viable por 2 o 3 días. El estigma permanece receptivo al polen por 8 a 10 días, y la fertilización ocurre de 24–48 horas, después de la polinización.

El fruto es un “agregado” compuesto de muchos ovarios, cada uno con un simple óvulo. Las semillas resultado del proceso de polinización se llaman “aquenios” y son el verdadero fruto de la fresa. El embrión consiste de dos cotiledones largos y semi elípticos. Dada la estructura morfológica de la fresa, esta requiere ser polinizada por insectos, tienen un porte bajo, son herbáceas perennes, con capacidad para multiplicarse vegetativamente y sus frutos están hechos para ser dispersados por los animales (Liston *et al.*, 2014).

MÉTODOS DE MEJORAMIENTO EMPLEADOS EN EL CULTIVO DE LA FRESA

El mejoramiento genético

El mejoramiento genético, definido según el diccionario de Ciencias Hortícolas (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 1999), como la aplicación de técnicas genéticas para la obtención de variedades vegetales o razas animales que son superiores en productividad, resistencia, calidad, etc. La mejora genética es una selección que se hace posible por la existencia de una variabilidad natural o provocándola mediante técnicas diversas. Las técnicas de mejora genética actualmente en uso son la hibridación mediante cruzamientos dirigidos, la selección de mutaciones gemarias o de híbridos espontáneos, la inducción y selección de mutaciones en yemas y semillas además de la mejora mediante métodos biotecnológicos (ingeniería genética, selección asistida por marcadores moleculares) (Llacèr, 2005).

El ser humano en su continua búsqueda del conocimiento y sobre todo de la satisfacción de sus necesidades básicas como por ejemplo la comida, ha seleccionado las plantas y animales que le son de mayor utilidad, mediante un procedimiento muy sencillo como elegir los individuos portadores de los caracteres deseables (progenitores) y cruzarlos entre sí, seleccionando en su descendencia a los individuos promisorios. En otros casos no era posible efectuar los cruces, y el proceso de selección se reducía solo a usar los individuos promisorios encontrados y reproducirlos de manera vegetativa; aun hoy se procede así. Con el paso de los años, esta actividad fue tomando forma de disciplina surgiendo la ciencia conocida como genética, que más tarde se especializó en vegetal, animal y humana. Esta disciplina ofreció al mejorador los conocimientos para hacer más

eficiente este trabajo ya que permitió cuantificar la contribución de la variación fenotípica de los componentes genético, ambiental y de la interacción entre ambos; esto permite escoger para la selección las características con mayor aporte genético y velar cuidadosamente por el manejo de los materiales seleccionados, cuya interacción depende en gran medida de la mencionada interacción genotipo y ambiente (Cornide, 2001).

Dentro de los primeros caracteres a mejorar se encuentran los asociados al rendimiento agrícola, seguidos por los del rendimiento industrial o la calidad comercial, la resistencia a enfermedades y plagas, la tolerancia a condiciones adversas y por último los asociados a la diversificación de productos agrícolas.

Es evidente que estos criterios también se han ido modificando con el pasar de los años, ya que en un primer momento se fueron seleccionando materiales de amplia o general adaptación, para posteriormente seleccionar materiales de adaptación regional, pasando a ser altamente especializados para ciertas condiciones ambientales, creando plantas altamente productivas adaptadas a nichos específicos, pero que requerían de una alta cantidad de insumos; ahora vivimos la tercera etapa o periodo del mejoramiento, en donde aún no se han producido cambios importantes en el potencial de rendimiento, pero se empiezan a tener resultados a partir de la comprensión y estudio de los mecanismos moleculares que se presentan en el proceso de recombinación meiótica, y de la manipulación de la estructura y composición de los genes.

En la actualidad cobran importancia en el proceso de mejora y selección, la calidad del producto obtenido junto a la cantidad o rendimiento agronómico; esto surge gracias al exceso de producción de algunos cultivos en los países desarrollados, en primera

instancia el concepto de calidad va ligado a la calidad sensorial, después a la calidad nutricional y sanitaria, (Bonet, G. 2010). Los criterios de calidad no siempre benefician a los consumidores ya que dependen de criterios de las cadenas de distribución. En frutales por ejemplo, los esfuerzos se han dedicado a mejorar la apariencia externa más que la calidad nutricional (Llacèr, 2005).

Sin embargo, la casi totalidad de variedades modernas provienen del mejoramiento genético tradicional y de métodos tales como la inducción de mutaciones, el aprovechamiento de la variación somaclonal y en menor medida de la transferencia de genes foráneos por medio de la ingeniería genética, en la mejora de características específicas de algunas variedades, para extender su vida útil.

El mejoramiento genético en la fresa

La fresa es un frutal que se ha cultivado por cientos de años, en las latitudes donde son endémicas como en el hemisferio norte y también en el sur de América, por tanto, el hombre ha consumido esta frutilla por milenios. Incluso existen evidencias arqueológicas donde se demuestra que *Fragaria chiloensis* fue domesticada por las etnias Pinuche y Mapuche hace más de 1000 años; Se sabe que *Fragaria virginiana*, es originaria del extremo norte del continente Americano, sin embargo, no existen evidencias de que la gente de aquellas áreas hallan cultivado esta especie. Por otro lado, en Europa se ha cultivado *Fragaria vesca*, al menos desde la época de los Romanos, y *Fragaria mochatata*, al menos desde el siglo XVI (Liston *et al.*, 2014).

Las especies del género *Fragaria* se distribuyen en un rango muy amplio bajo diferentes habitad y elevaciones, desde las dunas al nivel del mar, en las praderas más productivas hasta las cumbres de las montañas secas lo que indica una amplia adaptación ecológica

dentro y entre especies del género. Es dentro de esta variación donde se encuentra precisamente una fuente potencial de variación genética para rasgos como la tolerancia a factores climáticos, a plagas y enfermedades y caracteres asociados al rendimiento. Esta variación da la oportunidad de investigar los factores genómicos ecológicos de algunos rasgos como la época de floración, sequía y resistencia al frío (Sønsteby y Heide, 2011).

La fresa que se cultiva en la actualidad es resultado de la cruce entre dos especies de fresa procedentes del continente Americano, que son: *Fragaria chiloensis* X *Fragaria virginiana*; se comenta que esta cruce inicial proviene de Europa y que se hizo en el siglo XVIII por Antoine Nicolas Duchesne (1747-1827); sin embargo, existen pruebas de cruces espontáneas entre estas dos especies de fresa en el noroeste de América del norte, es altamente probable que las variedades de hoy en día posean genes de ambas fuentes, (Hancock *et al.*, 1991; Liston *et al.*, 2014).

No cabe lugar a dudas sobre la importancia que el fruto de la fresa tiene entre los consumidores; por tal motivo, se la ha cultivado durante cientos de años, generando una gran cantidad de variedades a partir del cultivo continuo, pero la planta tiene ciertas características en sus hábitos de reproducción que la hacen motivo de estudio; por ejemplo: es interesante denotar como la fresa cultivada que es hermafrodita auto-compatible, fue originada a partir de dos especies octaploide silvestres que muestran dimorfismo de género, *Fragaria chiloensis* es dioica (presenta plantas macho y hembra) y *Fragaria virginiana*, tiene plantas dioicas además de hermafroditas (ambos sexos en la misma flor). Por otra parte, dada la naturaleza poliploide natural de estas plantas, dan la oportunidad de estudiar el mecanismo de evolución de los organismos poliploides y ser

un modelo excepcional para entender sus sistemas de reproducción y los mecanismos evolucionarios de sus cromosomas.

También es interesante notar que la cruce hecha por Duchensen en el siglo XVIII, se considera como la base de todas las variedades de fresa cultivada que existen, y que la cruce libre entre los dos progenitores iniciales es difícil de que se produzca de forma libre en la naturaleza; queda lugar a la suposición, que el germoplasma posee una base genética restringida; sin embargo, algunos programas de mejoramiento sobre todo los que se encuentran en América, han ocupado germoplasma nativo, mediante introgresiones de *F. virginiana* y *F. chiloensis*, para incrementar la variabilidad de sus selecciones. Aunque los mejoradores la han dado mucha atención a la hibridación inter-específica de *Fragaria* silvestre y la octaploide cultivada, por medio de cruces sexuales, para incrementar la variabilidad genética en su germoplasma, existen algunas barreras de incompatibilidad sexual entre plantas de diferente nivel de ploidia, que hacen difícil la introgresión de los caracteres deseados, resultando semillas no viables o una serie de individuos estériles. Otra limitante es que cuando se logra obtener progenie de la cruce entre fresa silvestre y cultivada, la retro cruce con *Fragaria* octaploide cultivada resulta en una baja fertilidad. La barrera de la ploidia se ha sobrepasado con la creación de octaploides sintéticos (Guelph syntetic octaploid 1 y 2). Guelph 1 es híbrido de *Fragaria moschata* hexaploide y *Fragaria nubicola* diploide; Guelph SO2, es la cruce exitosa de *Fragaria vesca*, diploide y *Fragaria viridis*, diploide, la cual después de la duplicación cromosómica se cruzó con *Fragaria moupinensis*, tetraploide. Al final el híbrido inter específico se trató mediante colchicina para producir una planta octaploide, mismo que no presentó incompatibilidad con la fresa cultivada (Sangiaco y Sullivan, 1994).

El hecho de que la fresa tenga una restringida base genética, y que la especie es susceptible a la depresión endogámica, indica que el fenómeno de heterosis se manifiesta de manera importante; el inconveniente radica en que la planta es susceptible a cualquier estrés causado por factores bióticos y abióticos; además, puede resultar difícil y lento el desarrollar nuevos cultivares; como respuesta a estos problemas se ha intentado hacer introgresiones de germoplasma silvestre a la fresa cultivada pero lo anterior tiene ciertas limitaciones tales como: la posibilidad de incorporar alelos no favorables ligados a caracteres de interés, además, se requieren varios ciclos de selección (al menos tres generaciones de retrocruza) para reestablecer los estándares de calidad; en especial cuando se usa germoplasma proveniente de *Fragaria Virginiana*, ya que presenta frutos muy suaves. Debido a esto se ha intentado reconstruir la cruce original que dio origen la fresa cultivada (Stegmeir *et al.*, 2010; Hancock *et al.*, 2010), para buscar nuevos rasgos que se pudieron haber omitido en la cruce fortuita original.

Mejoramiento genético tradicional

El mejoramiento genético tradicional de la fresa cultivada comenzó después de ser originada, a mediados del siglo XVIII, sin embargo, se intensificó en la segunda mitad del siglo XX, surgiendo varios programas de mejoramiento alrededor del mundo (Gil-Ariza *et al.*, 2009). La planta de fresa en comparación con otras especies frutales, resulta ser muy atractiva para los esfuerzos de mejoramiento genético, ya que tiene varias ventajas como son: ocupa poco espacio, se pueden obtener muchas plántulas en poco espacio, tienen un ciclo corto, lo que permite hacer varios ciclos de selección por año; estos factores, aunado al valor potencial de la producción, han hecho que aparezcan docenas de programas de mejoramiento, tanto públicos como privados, al pasar de los años, la

mayoría aún siguen activos y otros se han quedado en el camino. Se dice que la fresa es uno de los cultivos hortícolas más jóvenes, sin embargo, es uno de los que ha cambiado más rápidamente, como resultado de ello se ha logrado rápidos incrementos en el rendimiento, gracias en parte a la mejora de labores culturales o de manejo y también al surgimiento de variedades con mejores características como: frutos más grandes, firmes y en mayor cantidad. Desde 1960 a la fecha el incremento en el rendimiento se logró duplicar y en algunas zonas como España y California, el rendimiento ha subido más de 10 veces (Stewart, 2012).

Al comienzo del nuevo milenio había ya programas de mejoramiento genético en fresa en 40 países tanto públicos como privados, y de esos 35 países han estado liberando variedades desde 1980. Esas variedades las desarrollaron 79 instituciones de educación pública y 52 compañías privadas. Los principales programas de mejoramiento se concentran en EUA (34 programas de los cuales 16 son privados), Europa (17 programas, de los que 2 son privados) y Asia (19 programas de los que 1 es privado). La dinámica actual es la de colaboración entre instituciones para acelerar la generación de variedades. Los países que liberan más variedades son: USA (98 desde 1980, de las cuales 56 son de California), Francia (48), Canadá (37), Italia (34) y Japón (26) (Faedi *et al.*, 2002). Tan solo en 2014, en Europa la empresa Driscoll Strawberry Associates Inc., aplicó para registro de fresa 20 genotipos (Community Plant Variety Office, 2014)

En la fresa, el mejoramiento genético tradicional ha desarrollado cultivares que ofrecen una producción acorde a alguna ventana de comercialización, con mejor tolerancia a los factores ambientales adversos y con resistencia a enfermedades, con fruto más grande y en cantidades abundantes, en la mayoría de las veces. El paso más importante para

formar un programa de mejoramiento genético en fresa y en cualquier otro cultivo es contar con una colección de germoplasma diversa, mejor si proviene de varias latitudes con plantas adaptadas a diferentes condiciones ambientales y edáficas. Se pueden lograr colectas (si se cuenta con los suficientes recursos) como la del Banco de Germoplasma de la USDA, localizado en Corvallis, Oregon (USDA Germoplasm Repository in Corvallis, Oregon, USA); en este lugar cuentan con plantas que representan al género *Fragaria spp.*, en todos sus niveles de variación y que han sido colectadas de todo el planeta (Folta *et al.*, 2011), ó como la Colección de Germoplasma de Fresa, localizada en el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro de Churriana Málaga, España, la cual es una extraordinaria fuente de genes para programas de mejoramiento genético ya que contiene alrededor de 500 accesiones, 280 de las cuales pertenecen a *Fragaria x ananassa*, que provienen de diferentes áreas geográficas y algunas datan desde 1849 (Gil-Ariza *et al.*, 2009), Cada uno de los materiales presentes en la colección inicial deben estar caracterizadas morfológica y agronómicamente para poder diseñar un esquema de mejoramiento adecuado.

El siguiente paso para continuar con el proceso de mejoramiento, en el esquema tradicional, se escoge alguna metodología de selección acorde con los hábitos sexuales y morfológicos del cultivo. La fresa, por ser una planta con una alta heterocigocidad y sensible a los procesos de endogamia, es considerada como un cultivo de polinización cruzada (alógama). Por estas razones la metodología que mejor se adapta a sus hábitos y características es la selección recurrente, donde se cruzan los mejores genotipos (típicamente se hacen alrededor de 100 cruzas controladas anuales de entre 30 genotipos parentales o más), para hacer la selección; tomando registro genealógico

(pedigree) para llevar un mejor control de los cruces anuales, posteriormente la progenie se propaga vegetativamente, para vrear un campo de evaluación donde se instalen varias plantas de un mismo genotipo para su evaluación, (Gil-Ariza *et al.*, 2009; Whitaker, 2012).

Los rasgos que se evalúan cuando se comienzan los esfuerzos de mejoramiento son fenotípicos, como: tamaño y número de frutos, estolonización, rendimiento, color externo, tamaño de fruto, uniformidad de fruto, basadas en observaciones de campo. Cuando se cuenta con un número elevado de selecciones avanzadas que son promisorias, se evalúan otros rasgos como el contenido de sólidos solubles, la acidez titulable, azúcares individuales y compuestos volátiles; también se comparan con las variedades comerciales exitosas en la época de evaluación. Aunque se comenta que el proceso de mejoramiento genético en la fresa puede ser más sencillo que en otros frutales, no debe menospreciarse la complejidad del proceso; como ejemplo se cita a la Universidad de Florida, en donde los esfuerzos de mejoramiento comenzaron en 1968, y en el periodo comprendido entre esa fecha y 2011, han liberado un total de 10 variedades, (Florida belle 1975, Dover 1979, Sweet Charlie 1992, Rosa Linda 1996, Earlibrite 2000, Strawberry Festival 2000, Carmine 2002, Winter Dawn 2005, Florida Radiance 2008, Florida Elyana 2008); de estos solo Festival y Florida Radiance, fueron más exitosas (Whitaker *et al.*, 2011).

Según Faedi *et al.* (2002), la estrategia de mejoramiento depende de la heredabilidad de los rasgos a mejorar, y se basa, en la información fenotípica y los valores genéticos (breeding values), de los progenitores. La mayoría de los programas de mejoramiento se basan al menos inicialmente, en esquemas de apareamiento recombinante complementario, para tomar ventaja de la variabilidad no aditiva y de la aptitud

combinatoria específica, la selección se hace en la progenie que combinen los mejores caracteres de cada parental. En las generaciones siguientes se hace la verdadera selección para caracteres agronómicos mediante parámetros genéticos previamente medidos. Otro esquema resulta ser la evaluación fenotípica preferencial donde se cruzan dos padres que contengan el mismo carácter (i.e. largo de fruto), para promover la aparición de este carácter en la progenie.

Algunos programas también usan la introgresión de germoplasma silvestre como *Fragaria virginiana*, *F. chiloensis*, *F. mochata*, *F. viridis*, *F. vesca*, *F. viridis* y de *F. mochata*; sobre todo para buscar buen sabor y resistencia a enfermedades. Sin embargo, hoy en día estas introgresiones han sido de poco aporte para el desarrollo de la fresa cultivada y la mayoría de los programas usan como material base la fresa octaploide cultivada. Ya que el uso de especies silvestres en el mejoramiento genético representa una disminución de muchos caracteres hortícolas, como el rendimiento, tamaño de fruto y la firmeza. Otros problemas puede ser la posibilidad de incorporar alelos no favorables vinculados a los rasgos seleccionados, lo que indica que se requieren de varias generaciones de selección después del evento de retro cruce para restaurar la calidad de fruto y los estándares de la industria (Stegmeir *et al.*, 2010). Otra barrera que dificulta el hacer introgresiones de especies silvestres radica en su nivel de ploidia, cuando se desean hacer cruza con especies diploides y tetraploides. Sin embargo la barrera de la ploidia se ha sobrepasado con la creación de octaploides sintéticos como lo son el Guelph SO1, obtenido por duplicación cromosómica del híbrido inter específico de la cruza de una especie hexaploide por una diploide y SO2, creado a partir de la duplicación cromosómica de la cruza de dos especies diploides, cuya progenie se cruzó con una

especie tetraploide, donde a esta última progenie se le aplicó colchicina, para producir una planta octaploide, (Sangiaco y Sullivan, 1994).

Uno de los logros más significativos al usar esta técnica (introgresión de germoplasma silvestre) fue la introducción del carácter de día neutro, en la Universidad de California en las décadas de los 70 y 80`s, derivada de una selección de *F. virginiana subsp. Glauca*, otros caracteres que pueden ser incorporados son: una tasa fotosintética alta, bajos requerimientos de fertilización, tolerancia al calor, resistencia a los patógenos del suelo y vigor (Stewart, 2012).

Otra alternativa para generar variabilidad en el cultivo de la fresa, es reconstruir la cruce que dio origen a la fresa cultivada entre *F. virginiana x F. chiloensis* (Luby *et al.*, 2008; Hancock *et al.*, 2010; Stegmeir *et al.*, 2010), existen muchas ventajas para usar el esquema de reconstrucción de la cruce original, la principal y más obvia es que se incrementa la variabilidad en la diversidad genética de la especie *F x ananassa*, misma que no solo le permitiría al mejorador tener una amplia variedad de genes de donde seleccionar, si no también pueden aparecer interacciones epistáticas asociados a los caracteres hortícolas deseados. Pero si la población de materiales nativos que se colectó es lo suficientemente grande, se podrían seleccionar un grupo amplio de caracteres positivos con un nivel mínimo de combinaciones deletéreas.

El esquema para reconstruir la cruce original de la fresa cultivada es según, Hancock *et al.*, (2010), el siguiente: i) seleccionar clones élites de *F. chiloensis* y *F. virginiana*, a partir de experiencia propia o de publicaciones previas; ii) hacer cruces intra poblacionales en las selecciones de ambas especies para caracterizar líneas avanzadas con rasgos superiores; iii) volver a hacer selección intra poblacional para seleccionar los

genotipos más promisorios; iv) hacer cruzas inter específicas para reconstruir la cruce de *F. x ananassa*, original entre las selecciones de *F. virginiana* y *F. chiloensis*; v) hacer selección de la progenie resultante para escoger los mejores genotipos, de *F. x ananassa*, mismas que se pueden usar para seguir con el proceso de mejora o para declararlas como variedades si pasan las pruebas pertinentes.

Mejoramiento enfocado a calidad del fruto

Los frutos de las fresas silvestres son muy pequeños y solo alcanzan algunos gramos de peso, sin embargo, los de la fresa cultivada son más grandes; con el paso del tiempo, la ganancia en tamaño y peso se ha ido incrementando; es difícil comparar los datos en cuanto a tamaño de fruto entre diferentes estudios, ya que los criterios de medición son diferentes entre épocas, regiones y temporadas. Pero la tendencia es clara en las variedades comerciales, seleccionar frutos cada vez más grandes; por ejemplo, la variedad Tioga en 1966, tenía un promedio de 15 gr por fruto, mientras que Albion liberada en 2005, promediaba 33 gr de acuerdo a los descriptores varietales y la variedad de Driscolls Strawberries Associates, Sanibel, promedia 32 gr por fruto. Estas ganancias son el producto de la mejora en la uniformidad de los frutos, eliminando los frutos más pequeños y menos productivos (Stewart, 2012).

El principal parámetro a medir en cuanto a calidad del fruto, es el tamaño, se prefieren frutos superiores a los 30 gramos, de forma cónica – alargada, de color rojo brillante, aunque también se pueden evaluar parámetros como el color externo, color interno, brillo; otras variables que se miden son: la resistencia de la epidermis, la firmeza; y por último se le hacen análisis químico de calidad como: contenido de sólidos totales, contenido de vitaminas, y análisis de ácidos individuales. El principal objetivo es incrementar el tamaño

y uniformidad de los frutos por planta, así se logra reducir el número de frutos de desecho. Lo anterior no solo resulta en producir frutos atractivos para el consumidor, sino también en incrementar la eficiencia de cosecha. Se han hecho esfuerzos por incrementar el color rojo en el tejido interno del fruto, asumiendo que el fruto será más aceptado por el consumidor; para ello, se evalúa el color de la pulpa interna del fruto pero se ha encontrado que no existe correlación entre el color de la parte interna y externa del fruto, lo que indica que estos rasgos son regulados por genes independientes; sin embargo, se pueden presentar correlaciones negativas entre el color de la parte interna del receptáculo del fruto y otros rasgos de interés (Whitaker *et al.*, 2011)

El tamaño de fruto es heredado de forma cuantitativa con seis a ocho pares de alelos controlando la expansión del fruto. En cuanto a la posición del fruto en la inflorescencia existe una tendencia en reducir su tamaño a partir de los primarios hacia los inferiores. Una gran parte de la variación genética para este carácter es epistática, aunque existe también una gran porción de efectos aditivos, esto depende de los progenitores. La firmeza y tenacidad de la epidermis se correlacionan de manera positiva y se heredan de manera cuantitativa, (Hancock, 2008).

Según Ara *et al.* (2009), en base en resultados de análisis de correlación, sugiere que durante el proceso de selección se debe poner mayor énfasis en los caracteres siguientes: número de hojas, número de estolones por planta y número de frutos por planta, ya que estos tienen un efecto positivo sobre los componentes de rendimiento en la fresa.

Esfuerzos como los de Zorrilla-Fontanesi *et al.* (2011), han tratado de encontrar marcadores moleculares (QTL`s) asociados a 17 caracteres de calidad de fruto con la

finalidad de implementar mejoramiento asistido por marcadores moleculares, sin embargo, se han encontrado con la desventaja de que la implementación de esta técnica está limitada en gran medida por la estabilidad y complejidad de los marcadores asociados al carácter de interés en diferentes ambientes. En su estudio identificaron 33 QTL`s, para 14 de los 17 caracteres que estudiaron y el 37 % fueron estables en el tiempo; identificaron de 1 a 5 QTL`s, con efectos individuales proporcionando de entre un 9.2 a un 30.5 % de la variación fenotípica, lo que sugirió que todos los caracteres que evaluaron son complejos y de herencia cuantitativa.

Mejoramiento enfocado a los hábitos de floración

En el mercado podemos encontrar plantas de fresa de día corto, de día largo y de día neutro (insensibles al fotoperiodo); el incremento en la producción en el cultivo de fresa se debe en parte, al desarrollo de cultivares remontantes o que florecen todo el año, a través del descubrimiento de plantas con hábito de floración de “día neutro” o “everbearing” (que producen fruto siempre). El estado natural de la mayoría de las especies de fresa es florecer cuando los días se hacen cada vez más cortos a finales de verano, con hábito de día corto. La expresión del fotoperiodo es obviamente influenciada por el ambiente, en particular por la temperatura, con temperaturas bajas, se favorece la floración aun cuando la planta crece bajo condiciones de día largo. Las plantas de hábito remontante permiten una producción más estable, sobre todo en aquellos lugares donde se pueden tener temporadas largas de producción como es el caso de México, Florida y España; además de reducir riesgos y permitir la producción en zonas donde de otra manera no sería viable (Stewart, 2012).

Folta y Davis (2006), comentan que se ha tratado de entender la base genética de este rasgo, demostrando que en especies diploides el carácter de día neutro o remontante, es controlado por un solo locus, y que este es recesivo en comparación al tipo silvestre; sin embargo, a nivel de especies octaploides se considera un rasgo poli genético, donde uno o más loci ejercen mayor influencia, dependiendo también de los antecedentes genéticos de la variedad y del ambiente. Se cree que este hábito se puede introducir fácilmente a partir de poblaciones silvestres.

En trabajos como el de Sugimoto *et al.* (2005); Weebadde *et al.* (2008), donde usan el enfoque de construcción de mapas de ligamento para encontrar QTL`s que representen la variación del carácter de día neutro, concluyen que este carácter es poli génico, sin embargo los QTL`s que encontraron no representan más del 36 % de la variación del carácter, y comentan que el hábito de día neutro puede ser regulado por varios loci activados por la variación climática, ya que existe una fuerte interacción entre la floración y la temperatura, en el cultivo de la fresa. Consideran que el QTL LG28, juega un papel importante para la iniciación floral en condiciones de temperaturas cálidas, mismo que no se expresa en temperaturas templadas.

Cuando las temperaturas están por debajo de los 15° C, todos los genotipos son susceptibles o sensibles a cambios en el fotoperiodo y cuando las temperaturas se presentan por encima de los 26 °C, se inhibe la floración sin importar el fotoperiodo (Bradford *et al.*, 2010).

Mejoramiento enfocado a resistencia de enfermedades

La fresa es susceptible a muchas enfermedades, y la pérdida de rendimiento a causa de factores bióticos puede llegar a ser hasta del 100%. Sería de gran provecho para el productor el desarrollar variedades que tengan resistencia a los principales patógenos que atacan al cultivo; por tal motivo se ha intentado encontrar algunos marcadores asociados a genes de resistencia mediante mapeo y otras técnicas genéticas, pero también se han probado los encontrados en otras especies, (Folta y Davis, 2006).

Se han identificado varios loci que confieren resistencia a patógenos, como los cinco genes de avirulencia encontrados en variedades europeas, relacionados con *Phytophthora fragariae*, el agente causal de la pudrición roja de la corona, y los diez genes encontrados en variedades americanas, para resistencia a la misma enfermedad; se postula que la resistencia a *Phytophthora fragaria* var. *Fragaria* está controlada por un gen de efectos mayores y para el caso de *Phytophthora fragaria* var. *rubi* se considera que está controlado por un modelo de dos genes con efectos de dominancia. Para el caso de *Fragaria cactorum* no se encontró un modelo simple de resistencia en *F. x ananassa*, lo que indica una herencia aditiva, poli génica, donde se han encontrado cinco probables QTL loci en una población de fresa cultivada. Se ha buscado resistencia para esta enfermedad en las especies silvestres relativas diploides de fresa, dado que se ha observado una alta colinearidad y sintenia entre el genoma diploide y octaploide se espera que los estudios en el primero, se pueda extrapolar al segundo (Eikemo *et al.*, 2010).

Olbricht y Hanke (2008) y Pérez-Jiménez *et al.* (2012), evaluaron nueve cultivares de fresa para hallar resistencia a tres enfermedades distintas: (*Phytophthora cactorum*,

Verticillium dahliae kleb. y *Xantomonas fragariae*), donde no encontraron una variedad con resistencia universal a las mencionadas enfermedades, lo atribuyen a el análisis de una colecta limitada de variedades y concluyen que no existe una variedad con buena calidad, vida de anaquel y resistencia a enfermedades; sin embargo, encontraron que la variedad “sabrosa”, presentó resistencia a dos de las enfermedades evaluadas. Lo anterior anima a los mejoradores a buscar dentro de las progenies que evalúan resistencia a las enfermedades más importantes de fresa.

Una de las enfermedades más destructivas en el cultivo es *Botritis cinérea*; este hongo necrotrófico produce pérdidas masivas en pre y post cosecha, además infecta a diverentes órganos de la planta es dispersado por la lluvia; incluso muchas variedades que son resistentes a otras enfermedades como *Anthracnosis*, tienen una susceptibilidad alta a *Botritis*. (Landi *et al.* 2014); se ha estudiado la expresión algunos genes como respuesta al tratamiento de elicitores, mismos que activan los mencionados genes y promueven resistencia al ataque de *Botritis*, en frutos, donde se ha concluido que las aplicaciones de estas sustancias activan genes que desencadenan eventos fisiológicos (relacionados con la pared celular) que activan la protección del fruto al ataque de la enfermedad.

HERRAMIENTAS MOLECULARES EN EL CULTIVO DE LA FRESA

Uno de los primeros esfuerzos para desarrollar marcadores moleculares con fines de mejoramiento genético en cualquier cultivo es la construcción de mapas de ligamiento, donde mediante cruces de parentales previamente identificados y el posterior análisis de la progenie para cierto carácter se determina la posición del gen que maneja el

mencionado rasgo. En el género *Fragaria*, Sargent *et al.* (2004), crearon un mapa genético de ligamento para *Fragaria* diploide, mismo que mejoro dos años después agregando mayor cantidad de marcadores (Sargent *et al.* 2006). Recientemente Shulaev *et al.* (2010), usaron los mapas de referencia creados por Sargent *et al.* (2004, 2006), denominado mapa de referencia Fv x Fn, para hacer un mapa con la accesión #PI551572 de *F. vesca* accesión Hawái; en este estudio se compararon los resultados obtenidos con el mapa anterior, usando 390 marcadores e incluyendo los 234 marcadores mapeados en el mapa de referencia FV x Fn, (*Fragaria vesca* x *Fragaria nubicola*); la metodología empleada les permitió identificar nuevos SNP`s. con la información obtenida pudieron inferir relaciones filogenéticas con otras plantas de la familia Rosáceas.

Sargent *et al.* (2006) formularon modelos de predicción de genes, de donde obtuvieron 34 809, modelos de genes híbridos; junto con la identificación de genes de RNA: 569 de tRNA, 177 fragmentos de rRNA, 168 snRNA, 76 micro RNA y 24 de otros tipos de RNA, analizaron el genoma del cloroplasto. La construcción de estos mapas en especies diploides son los primeros pasos para poder analizar el complejo genoma de la fresa comercial de naturaleza octaploide.

El primer mapa de ligamento en la fresa cultivada fue desarrollado por Lerceteau-Kohler *et al.* (2003), este trabajo fue el punto de partida para entender el comportamiento cromosómico de la fresa octaploide, a pesar de que encontraron 43 grupos de ligamiento en ambos parentales, un resultado mucho mayor en comparación con los 28 grupos de ligamento esperados para cada uno. Durante el desarrollo de este trabajo, los autores llegaron a sugerir mediante análisis de segregación de los loci, analizados en fase de acoplamiento vs. repulsión, que la fresa octaploide poseía una tasa de segregación en

meiosis tanto polisómica como disómica. También determinaron que el origen del nivel de ploidía podía estar contribuido por hasta cuatro genomas distintos. En comparaciones posteriores del mapa de Lerceteau-Kohler *et al.* (2003), con el mapa de la población FV x FB, se demostró que la segregación alélica es principalmente disómica. Además se observó colinearidad entre los grupos de ligamento homólogos entre la fresa diploide y poliploide; esto indicó que durante el evento de poliplodización no hubo mayores cambios en el arreglo de los cromosomas. Lo que permite el mapeo comparativo entre especies del género *Fragaria*.

En otros estudios Sargent *et al.* (2009), encontraron 69 grupos de ligamento usando la población 'redgauntled x hapil' y no hallaron evidencia de comportamiento polisómico. Conociendo el comportamiento disómico del genoma octaploide de la fresa cultivada, los mejoradores pueden interpretar las tasas de segregación de cada marcador usado, la dosis única de los marcadores, para reconocer los sub-genomas individuales. Lo que resulta en la asociación de los marcadores con algunos rasgos de interés. Para asociar estos caracteres de interés a los marcadores deseados, se deben establecer los genes mayores o los loci de rasgos cuantitativos (QTL, quantitative trait loci), en el caso de la fresa se han encontrado algunas asociaciones como puede ser:

Resistencia a enfermedades

Esta es el área de mayor avance en este campo. El primer marcador asociado fue el locus *Rpf1*, (Korbin, 2011), un gen dominante simple que confiere resistencia a *Phytopthora fragariae var. Fragariae*, el agente causal de la pudrición de la corona; para el mapeo de este gen se requirieron de 7 RAPD`s, ligados al locus *Rpf1*, con una cercanía de 3 cM. Posteriormente se convirtieron los marcadores RAPD`s a marcadores tipo

SCAR, de tal forma que se facilite su repetitividad entre laboratorios. Sin embargo, no se han dado casos en que este gen sea usado en algún programa de mejoramiento para resistencia ya que se requiere de contar con más locus para realizar, una selección efectiva.

El segundo gen para resistencia en fresa es el Rca2, un gen que está asociado a resistencia a *Colletotricum acutatum*, y cosnta de dos SCAR`s; este gen resulta ser un candidato excelente para realizar MAS (Whitaker, 2011). Una condición para que la selección sea efectiva es que los dos SCAR`s estén presentes y ligados en los parentales resistentes. El único inconveniente es que QTL no confiere resistencia al grupo 1 de patogenicidad de *Colletotricum acutatum*.

Fotoperiodo

La mayoría de las variedades de fresa son de fotoperiodo corto, lo que significa que requieren de una duración menor de 14 horas para florecer y solo un número pequeño de genotipos se consideran como de foto periodo neutro. El carácter de día neutro está dado por la presencia de dos alelos recesivos en el locus de floración estacional (SFL) (Albani *et al.*, 2004). En un principio, el locus se marcó con SSR`s, sin embargo, posteriormente se convirtieron a SCAR`s. Desafortunadamente el modelo diploide no es directamente transferible a *Fragaria* octaploide, donde la floración repetida esta heredada de manera dominante. Weebadde *et al.* (2007), describieron nueve QTL`s para este carácter describiendo el 36 % de la variación, el rasgo de día neutro podría no estar controlado por un locus mayor. Sin embargo, con la saturación de marcadores, podrían identificar un QTL mayor. En otro estudio, Sugimoto *et al.* (2005), mediante RAPD`s,

confirmó la presencia de un locus simple dominante, para esta característica, sin embargo; no estuvieron lo suficientemente cerca para ser usados como herramienta de selección.

Esterilidad masculina y femenina

La planta de fresa es hermafrodita, sin embargo *F. virginiana* y *F. chiloensis* presentan esterilidad masculina y femenina. Mediante mapeo usando 350 SSR con 30 grupos de ligamento en cada parental, el mapa de ligamento reveló que el género está determinado por dos loci ligados, uno para la esterilidad femenina y otra para la masculina, con recombinación limitada entre ellos. Mediante mapeo comparativo el grupo homólogo en *Fragaria* se identificó como LG6, (Spigler *et al.*, 2010)

Composición genómica de la fresa

El género *fragaria* incluye 13 especies diploides, un híbrido interespecífico trípode (*F. x bífera*), además existen especies octaploides, hexaploides y tetraploides; también se han derivado decaploides mediante hibridación inter específica acompañada de duplicación cromosómica inducida, esta variabilidad demuestra lo complejo del género. En la fresa cultivada se han hecho estudios citológicos de apareamiento meiótico para definir un modelo de composición genómica en la especie, se llegó a la conclusión que en *Fragaria x ananassa*, existe solo apareamiento bivalente o preferencial y patrones de herencia disómica, característica de los aloploiploides (los genomas que lo componen provienen de dos a mas especies diferentes). El comportamiento disómico se puede distinguir del polisómico comparando el número de loci o grupos de ligamento ligados en las fases de acoplamiento vs la fase de repulsión, o a través del análisis de la tasa de segregación de los marcadores única o múltiple; lo anterior indica que de algún modo los cuatro juegos

de cromosomas de un genoma encuentran su homólogo y se aparean entre sí. Dilucidar el tipo de herencia en la fresa octaploide es de gran importancia para clarificar dudas filogenéticas en la especie, así como desarrollar estrategias para el mejoramiento molecular asistido (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008).

El modelo de composición genómica toma en cuenta el número de contribuciones del genoma diploide original al hexaploide e implica que existen dos genomas distintos estos son el tipo A y el tipo B, con la diferenciación entre los tipos A vs A` y B vs B`, diferenciando dentro de cada uno los tipos mayores, así el modelo de la fresa octaploide propuesto es AAA'A'BBB'B', (Hirakawa *et al.*, 2014).

Identificación del germoplasma

Las diversas técnicas de marcadores moleculares permiten definir ¿qué genes o alelos específicos contiene un genoma?, además arrojan productos simples y reproducibles para intentar identificar la variabilidad entre individuos, se basan en la identificación de los ácidos nucleicos, aunque también pueden identificar variantes de enzimas específicas asociadas con algún carácter cuantitativo determinado. Un biomarcador que represente fielmente un carácter de interés es de gran valor, estas técnicas no se han implementado en programas públicos de mejoramiento en fresa y por el contrario, las empresas privadas utilizan el poder de estas técnicas para delimitar el número de líneas a seleccionar durante su programa de mejoramiento anual; sin embargo, el principal uso de este tipo de herramientas es para describir el genoma de la fresa (Folta *et al.*, 2011).

En el cultivo de la fresa se han utilizado una serie de técnicas moleculares, principalmente las basadas en estrategias sobre PCR. Los estudios más prematuros se han utilizado

para establecer análisis de la huella y el diagrama de diversidad genética (Govan *et al.* 2008; Arnau *et al.* 2003). El uso de técnicas basadas en PCR en sus enfoques de RAPD (amplificación de ADN polimórfico aleatorio) o AFLPs presentan aún algunos desafíos a vencer cuando se desea crear una huella genética; estos métodos son arbitrarios, y que al manejar la secuencia del genoma se puede alterar el tamaño de la amplificación; además pueden verse influenciados por la calidad del ADN obtenido, iones, temperatura y una serie de otras variables que pueden salirse de control en el laboratorio, limitando su aplicación. Mientras que los métodos basados en PCR pueden considerarse poco fiables y su aplicación ha conseguido varios éxitos en los objetivos planteados de algunas investigaciones. La técnica de RAPDS se ha usado en la identificación de cultivares; estudios de diversidad genética, para la creación de mapas de enlace genético (Davis y Yu, 1997; Korbin *et al.* 2002). La técnica de AFLP se ha usado para establecer el mapa genético en *F. x ananassa* (Lerceteau- Köhler *et al.* 2003). Los métodos basados en marcadores moleculares se han usado como complemento de otros métodos (Korbin *et al.* 2002)

Otra técnica utilizada en la descripción genética de la fresa es el uso de microsatélites de secuencias simples repetidas (SSR), que representan la expansión variable de las repeticiones de los polinucleotidos, secciones cortas de ADN y secuencias redundantes, mide ¿qué tan rápido se expanden y contraen con el tiempo?, Ya que estos se originan de secuencias primarias y se ligan en sitios conocidos, pueden ser amplificados y analizados de forma confiable. Se han desarrollado microsatélites para especies de diferentes niveles de ploidias: para la fresa cultivada octaploide, *F. x ananassa* (Davis *et*

al. 2006; Rousseau-Gueutin *et al.* 2008), para *F. virginiana* (Ashley *et al.* 2003), para la especie diploide, *F. vesca* (James *et al.* 2003; Ciprani y Testolin, 2004).

Las técnicas de marcadores moleculares se han utilizado también para elaborar mapas genéticos, donde se describe la posición de los genes, en la fresa se ha realizado en organismos con diferentes niveles de ploidía. El primer mapa generado para fresa que fue reportado se construyó mediante la técnica de marcadores de RAPD, el mapa cubre 445 centimorgans (cM), divididos en siete grupos enlazados, y se comprimió en 75 RAPDS. El mapa publicado inicialmente consistió en 68 micro satélites, se amplificó una secuencia de una región caracterizada por SCAR, seis marcadores para genes específicos y tres características morfológicas. El primer mapa genético en fresas poliploides se obtuvo usando la técnica de marcadores AFLP, se usó un pseudo test de cruce de dos vías y se generaron mapas para hembras y machos con grupos de enlace a 1 604 cM y 1496 cM de longitud, respectivamente; los grupos de enlace identificados se expandieron después usando la técnica de marcadores SSR. Más recientemente, se han usado otros dos mapas de grupos de enlace usando marcadores AFLP o SSR, con el objetivo de mapear el loci cuantitativo asociado a la característica de día neutro. Un mapeo comparativo entre genotipos diploides y octaploides reveló altos niveles de macrosintenia y colinearidad, lo cual sugiere que la poliploidización no provoca ninguna diferencia en el reordenamiento de los cromosomas (Folta, *et al.*, 2011).

BIBLIOGRAFÍA

- Albani M.C., N.H. Battey, y M.J. Wilkinson , (2004) The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 571-579. doi: 10.1007/s00122-004-1654-4.
- Ara T., A. Haydar, H. Mahmud, K.. Khalequzzaman, y M.. Hossain , (2009) ANALYSIS OF THE DIFFERENT PARAMETERS FOR FRUIT YIELD AND YIELD CONTRIBUTING. *Int. J. Sustain. Crop Prod* 4: 15-18. .
- Bonet, Gigante J. , (2010) Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en Fresa. Tesis.: Universidad Autónoma de barcelona.
- Bradford E., J.F. Hancock, y R.M. Warner , (2010) Interactions of Temperature and Photoperiod Determine Expression of Repeat Flowering in Strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135: 102 -107. .
- Community Plant Variety Office , (2014) *Annual Report 2014*. European Union, 2015, Italy.
- Cornide M.T. , (2001) La Genética Vegetal , El Mejoramiento Y La Sociedad. *Cultivos Tropicales* 22: 73-82. .
- Eikemo H., M.B. Brurberg, y J. Davik , (2010) Resistance to *Phytophthora cactorum* in diploid *Fragaria* species. *HortScience* 45: 193-197. .
- Faedi W., F. Mourgues, y C. Rosati , (2002) Strawberry breeding and varieties: Situation and perspectives. *Acta Horticulturae* 567: 51-59. .
- Folta K.M. y T.M. Davis , (2006) Strawberry genes and genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 399-415. doi: 10.1080/07352680600824831.
- Folta K.M., B. Denoyes-Rothan, M. Rousseau-Gueutin, y P.J. Stewart , (2011) Strawberry - Part 2: Genome Composition, Linkage Maps and Markers. En: *Genetics, genomics and breeding of berries* (Kole, C., ed.) Science Publishers, p. 138-161.
- Gil-Ariza D.J., I. Amaya, J.M. López-Aranda, J.F. Sánchez-Sevilla, M. Ángel Botella, y V. Valpuesta , (2009) Impact of Plant Breeding on the Genetic Diversity of Cultivated Strawberry as Revealed by Expressed Sequence Tag-derived Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134: 337-347. .
- Hancock J.F. (1999). Strawberries. 237 p.
- Hancock J.F. (2008). Temperate Fruit Crop Breeding. 233 p. doi: 10.1007/978-1-4020-6907-9.
- Hancock J.F., C.E. Finn, J.J. Luby, A. Dale, W.P. Callow, y S. Serc xe , (2010) Reconstruction of the Strawberry, *Fragaria -ananassa*, Using Genotypes of *F. virginiana* and *F. chiloensis*. *HortScience* 45: 1006-1013. .
- Hancock J.F., J.L. Maas, C.H. Shanks, P.J. Breen, y J.J. Luby , (1991) hancock.pdf.

Acta Horticulturae 290: 491-584. doi: 10.17660/ActaHortic.1991.290.11.

- 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, y S.N. Isobe , (2014) Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of fragaria species. *DNA Research* 21: 169-181. doi: 10.1093/dnares/dst049.
- Korbin M.U. , (2011) Molecular approaches to disease resistance in *Fragaria* spp. *Journal of Plant Protection Research* 51: 60-65. doi: 10.2478/v10045-011-0011-2.
- Landi L., E. Feliziani, y G. Romanazzi , (2014) Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 3047-3056. doi: 10.1021/jf404423x.
- Lerceteau-Kohler E., G. Guerin, F. Laigret, y B. Denoyes-Rothan , (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107: 619-628. doi: 10.1007/s00122-003-1300-6.
- Liston A., R. Cronn, y T.-L. Ashman , (2014) *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany* 101: 1686-1699. doi: 10.3732/ajb.1400140.
- Llacèr G. , (2005) Problemática actual de la mejora genética de frutales en España. *ITEA* 101: 364-372. .
- Luby J.J., J.F. Hancock, A. Dale, y S. Serçe , (2008) Reconstructing *Fragaria x ananassa* utilizing wild *F. virginiana* and *F. chiloensis*: Inheritance of winter injury, photoperiod sensitivity, fruit size, female fertility and disease resistance in hybrid progenies. *Euphytica* 163: 57-65. doi: 10.1007/s10681-007-9575-3.
- Olbricht K. y M. Hanke , (2008) Strawberry breeding for disease resistance in Dresden. En: *13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 18th February to 20th February 2008 at Weinsberg/Germany* (Boos, Markus (Ed.) Boos, Markus, (Hrsg.) Ecofrui, ed.) Weinsberg/Germany, p. 144-147.
- Pérez-Jiménez R.M., a. De Cal, P. Melgarejo, J. Cubero, C. Soria, T. Zea-Bonilla, y I. Larena , (2012) Resistance of several strawberry cultivars against three different pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10: 502-512. doi: 10.5424/sjar/2012102-345-11.
- Rousseau-Gueutin M., E. Lerceteau-Köhler, L. Barrot, D.J. Sargent, A. Monfort, D. Simpson, P. Arús, G. Guérin, y 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: 2045-60. doi: 10.1534/genetics.107.083840.

- Sangiaco M.A. y J. Sullivan , (1994) Introgression of wild species into the cultivated strawberry using synthetic octoploids. *Theoretical and Applied Genetics (TAG)* 88: 349-354. .
- 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, y N.H. Battey , (2006) An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik.* 112: 1349-59. doi: 10.1007/s00122-006-0237-y.
- Sargent D.J., T.M. Davis, K.R. Tobutt, M.J. Wilkinson, N.H. Battey, y D.W. Simpson , (2004) A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1385-1391. doi: 10.1007/s00122-004-1767-9.
- Sargent D.J., F. Fernández-Fernández, J.J. Ruiz-Roja, B.G. Sutherland, a. Passey, a. B. Whitehouse, y D.W. Simpson , (2009) A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Molecular Breeding* 24: 293-303. doi: 10.1007/s11032-009-9292-9.
- 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.G. Rees, K.P. Williams, S.H. Holt, J.J.R. Rojas, M. Chatterjee, B. Liu, H. Silva, L. Meisel, A. Adato, S. a Filichkin, M. Troggo, R. Viola, T.-L. Ashman, H. Wang, P. Dharmawardhana, J. Elser, R. Raja, H.D. Priest, D.W. Bryant, S.E. Fox, S. a Givan, L.J. Wilhelm, S. Naithani, A. Christoffels, D.Y. Salama, J. Carter, E.L. 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, y K.M. Folta , (2010) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* 43: 109-116. doi: 10.1038/ng.740.
- Sønsteby A. y O.M. Heide , (2011) Environmental regulation of dormancy and frost hardiness in Norwegian populations of wood strawberry (*Fragaria vesca* L.). *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 5: 42-48. .
- Spigler R.B., K.S. Lewers, A.L. Johnson, y T.-L. Ashman , (2010) Comparative mapping reveals autosomal origin of sex chromosome in octoploid *Fragaria virginiana*. *The Journal of heredity* 101 Suppl : s107-17. doi: 10.1093/jhered/esq001.
- Stegmeir T.L., C.E. Finn, y R.M. Warner , (2010) Performance of an Elite Strawberry Population Derived from Wild Germplasm of *Fragaria chiloensis*. *HortScience* 45: 1140-1145. .
- Stewart P.J. 2012. Strawberry: Part 4.1 *Fragaria* History and Breeding. En: *Genetics, genomics and breeding of berries*. (Folta, K.M., y Kole, C., eds.) Science Publishers, Clemton, SC, USA, p. 199.

- Sugimoto T., K. Tamaki, J. Matsumoto, Y. Yamamoto, K. Shiwaku, y K. Watanabe , (2005) Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. *Plant Breeding* 124: 498-501. doi: 10.1111/j.1439-0523.2005.01144.x.
- Weebadde C.K., D. Wang, C.E. Finn, K.S. Lewers, J.J. Luby, J. Bushakra, T.M. Sjulín, y J.F. Hancock , (2008) Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. *Plant Breeding* 127: 94-101. doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01430.x.
- Whitaker V. , (2011) Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research* 1: 115-127. doi: 10.3233/BR-2011-013.
- Whitaker V. , (2012) Estimation of genetic parameters for 12 fruit and vegetative traits in the University of Florida strawberry breeding population. *Journal of the ...* 137: 316-324. doi: 10.1007/s10681-011-0566-z.
- Whitaker V.M., T. Hasing, C.K. Chandler, A. Plotto, y E. Baldwin , (2011) Historical trends in strawberry fruit quality revealed by a trial of university of Florida cultivars and advanced selections. *HortScience* 46: 553-557. .
- Zorrilla-Fontanesi Y., A. Cabeza, P. Domínguez, J.J. Medina, V. Valpuesta, B. Denoyes-Rothan, J.F. Sánchez-Sevilla, y I. Amaya , (2011) Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 123: 755-78. doi: 10.1007/s00122-011-1624-6.

CAPÍTULO II: HUELLA GENÉTICA DE LAS VARIEDADES DE FRESA OBTENIDAS EN EL COLEGIO DE POSTGRADUADOS.

Martín Aguilar Tlatelpa

RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvo la huella genética de las variedades de fresa CP0201, CP0204, CP0615, CPLE7 y Festival, utilizando nueve micro-satélites (SSR). El proceso incluyó la estandarización, tanto de la extracción de ADN del tejido foliar de fresa; donde se probaron tres metodologías CTAB, ChargeSwitch® gDNA Plant kit, de Life Technologies y la solución extractora DNAzol®, así como de la estandarización del proceso de amplificación por vía PCR de los SSR. El tamaño de los productos de PCR fueron determinados mediante vía electroforesis capilar y con el programa GeneMapper® v. 4, el cual permitió la amplificación de los diferentes alelos en función de su tamaño en Pb, de la intensidad de la señal y del número de alelos amplificados. Se calcularon las matrices de distancia con dos coeficientes distintos a partir de los alelos amplificados, el de Jaccard y Dice. Se encontraron un total de 63 alelos distintos y cada iniciador amplificó entre 3 y 12 alelos. Los marcadores que presentaron mayor número de alelos fueron EMFn181 (11alelos) y EMFv104 (12 alelos). Con los datos recabados se generaron los perfiles de huella genética de cada variedad evaluada. Mediante los perfiles alélicos se pudieron encontrar diferencias entre las variedades CP0615, CPLE7 y Festival; sin embargo, CP0201 y CP0204 presentaron una huella genética similar, ya que están emparentadas mediante su progenitor femenino. Las variedades evaluadas tuvieron un índice de uniformidad bajo debido al alto nivel de polimorfismo de los marcadores usados, en tanto el índice de diversidad alélica dentro de las poblaciones varió entre 3.96 hasta 5.93.

Palabras clave: *Fragaria x ananassa*, huella genética, , SSR's, PCR.

INTRODUCCIÓN

El género *Fragaria*, forma parte de la familia Rosacea que agrupa unas 3,000 especies de 107 géneros y es una de las familias de mayor importancia a nivel mundial; se puede diferenciar en función de su nivel de ploidía, presenta desde diploides, tetraploides, hexaploides y octaploides; Sin embargo, *Fragaria x ananassa* es la especie más ampliamente cultivada, de naturaleza octaploide; se originó a partir de la cruce de dos especies silvestres octaploides: *F. virginiana* y *F. Chiloensis*. Todos los esfuerzos de mejoramiento genético en el cultivo de la fresa partieron de esta población inicial, y se considera que la fresa tiene una base genética reducida.

En México existen programas de mejoramiento genético, tanto públicos como privados, que han intentado dar solución a las problemáticas de los productores y consumidores, desarrollando variedades adaptadas a las condiciones climáticas de las zonas productoras. Posterior al desarrollo de una variedad surge la necesidad de clasificarla de manera fisiológica, morfológica y/o molecular, con la finalidad de mantener su integridad genética en todas y cada una de las etapas de incremento del germoplasma; para este propósito una de las herramientas más promisorias e importantes del cultivo son los marcadores moleculares (Whitaker, 2011).

Los marcadores moleculares nos permiten identificar poblaciones con una diversidad genética reducida y más vulnerables a un posible cambio ambiental, así como distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas del resto, descubrir genealogías génicas y conocer el grado de parentesco entre individuos (Graham *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996; Degani *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2006; Carbone *et al.*, 2006; Dangl *et al.*, 2007; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008; Gil-Ariza *et al.*, 2009). Otros usos son: identificación

varietal, para defensa de la propiedad intelectual, la evaluación de la pureza del material vegetal en viveros, la identificación de variación somaclonal en lotes de cultivo *in vitro* y evitar la mezcla de material vegetal en bancos de germoplasma.

Para la identificación varietal mediante el enfoque de los marcadores moleculares en fresa se han usado diversas técnicas, como los AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism) y RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) (Powell *et al.*, 1996; Degani *et al.*, 1998; Congiu *et al.*, 2000; Degani *et al.*, 2001; Arnau *et al.*, 2001; Tyrka *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2002). También se han usado los microsatélites SSR (Simple Sequence Repeat), que son arreglos de di-, tri- o tetra- nucleótidos, posicionados uno enseguida del otro, muy abundantes en todo el genoma eucariótico, codominantes, expresan varios alelos por locus, tienen un alto nivel de polimorfismo y su costo es menor en comparación con marcadores de generaciones anteriores (Arnau *et al.*, 2002; Shimomura y Hirashima, 2006; Gonzalez y Aguirre, 2007; Debnath y Ricard, 2009).

Los SSR se han convertido en los marcadores preferidos para la identificación varietal, tanto en el sector público como privado; además de la identificación varietal también se han usado en otras disciplinas (Debnath *et al.*, 2008). Son robustos, confiables, reproducibles y consistentes como identificadores genotípicos, también se han usado en la caracterización de poliploides (Holton *et al.*, 2002; Beovides *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Novo *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2011; Nantoumé *et al.*, 2013), en la caracterización molecular del cultivo de fresa (Arnau *et al.*, 2002; Sargent *et al.*, 2003; Hadonou *et al.*, 2004) y se ha probado su habilidad para distinguir entre variedades de fresa altamente relacionadas (Shimomura y Hirashima, 2006; Carrasco *et al.*, 2007; Dangl *et al.*, 2007; Debnath *et al.*, 2008; Hussein *et al.*, 2008; Debnath y

Ricard, 2009). De esta manera la caracterización molecular se presenta como una herramienta complementaria a la caracterización morfológica, donde una vez puesto a punto el proceso, se puede evaluar la integridad genética del material vegetal de manera rápida.

El objetivo del presente trabajo fue obtener la huella genética de las variedades de fresa del Colegio de Postgraduados CP0201 (Zamorana), CP0204 (Jacona), CPLE7, CP0615 y de la variedad comercial Festival mediante el uso de SSR, con nueve pares de primers.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para iniciar el proceso se colectó hoja de planta de fresa recientemente expandida, proveniente de invernadero, e inmediatamente colocada a -20°C antes del proceso de extracción de DNA. Se probaron tres metodologías para la extracción de ADN de fresa (En el kit ChargeSwitch® gDNA Plant kit, de Life Technologies (Invitrogene, 2006), la solución extractora Plant DNAzol® Reagent (Life Technologies, 2001) y la metodología de CTAB, (Porebski *et al.* 1997; Nunes *et al.* 2011).

Se hicieron algunas modificaciones a las metodologías en función de las necesidades de las plantas como se describe a continuación: En el kit ChargeSwitch®, se usaron 100 mg de tejido foliar, 600 µl de lisis, 100 µl de reactivo A, el cual se modificó agregando PVP 40 000 en lugar de usar PVP 10 000, 2µl de RNasa, 400 µl de buffer de precipitación; la separación y elusión del DNA se hizo con el robot de extracción KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors; el trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de extracción de DNA del área de Genética, en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos.

La segunda metodología fue CTAB, diseñada para plantas con alto contenido de poli fenoles y polisacáridos (Porebski *et al.* 1997; Nunes *et al.* 2011), se usaron 100 µg de

tejido foliar en 5 ml de buffer y 50 mg de PVP 40 000, 5 M NaCl, 10 mM tris-HCl, 1 M EDTA, 2 % CTAB, pH 8.

La tercer metodología fue la solución extractora Plant DNAzol se agregó PVP 40 000, con 100 µg de tejido foliar, 300 µl de reagent, 10 mg de PVP 40 000, la extracción se hizo con 300 µl de cloroformo y la precipitación con NaCl 5M, siguiendo las indicaciones del manual de usuario, el macerado de la muestra junto a al buffer de lisis se hizo con el macerador TissueLyser Quiajen®.

Tanto la metodología de CTAB como la de DNAzol se hicieron en el laboratorio de usos múltiples en el área de Fruticultura del Colegio de Postgraduados. Cada ensayo tuvo cinco repeticiones y se hicieron tres ensayos por cada una de las tres metodologías evaluadas.

La concentración expresada en nanogramos por microlitro (ng/µl) y la calidad de DNA en términos de Densidad óptica relación 260 y 280 nm de absorbancia ($DO_{260/280}$) se midió con un espectrofotómetro NanoDrop® 2000, Thermo Scientific, después se diluyó a 20 ng.µl⁻¹. Con el DNA extraído se hicieron pruebas de amplificación de los SSR. En función de las calidades de DNA se decidió tomar muestras con 1.3, 1.4 y 1.8 de $DO_{260/280}$ para ello se usaron tres repeticiones de cada calidad de DNA evaluada. Esta prueba se evaluó mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. En el proceso de amplificación de PCR se usaron las condiciones mencionadas por (Sargent *et al.*, 2003), sin embargo se requirió optimizar la técnica de PCR en función del equipo y condiciones del laboratorio como se explica a continuación: Se usó PCR de punto final en lugar de PCR Touch Down y se incrementaron los tiempos de reacción (desnaturalización inicial 4:00 min, desnaturalización 1:00 min, temperatura de

alineamiento 2:00 min, temperatura de elongación 2:00 min, el paso de extensión final 60:00 min).

Además, se corrieron pruebas en gradiente por cada par de primer, para determinar la temperatura de alineamiento óptima (T_a). Estas pruebas consistieron en probar ocho temperaturas distintas en un gradiente donde la temperatura decrece en 0.5 °C, a partir de la temperaturas base usadas en el programa de PCR touchdown (Sargent *et al.*, 2003).

En la reacción de PCR final se usó un volumen total de 25 μ l con 20 ng. μ l⁻¹ de DNA genómico, 1.5 μ M de MgCl₂, 10 pmol de cada primer, 1X PCR Buffer, 0.2 μ M de DNTP's, una unidad de DNA polimerasa, proveniente del kit GoTaq®, PROMEGA 500u. La configuración del programa de PCR constó de los siguientes pasos: Un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 4 min; 30 ciclos: desnaturalización de 95°C por 1 min, alineamiento por 2 min, extensión de 72°C por 2 min; por ultimo extensión final a 72°C por 60 min, en un termo-ciclador BIORAD modelo C1000 thermal cycler.

Para la caracterización molecular de las variedades de fresa se usaron un juego de nueve SSR's desarrollados para fresa diploide (Sargent *et al.*, 2003) y posteriormente probados en la fresa cultivada octaploide (Govan *et al.*, 2008; Brunings *et al.*, 2010), que se agruparon en tres reacciones multiplex, para lo cual se usó el programa Multiplex Manager, (Holleley y Geerts, 2009), se etiquetaron con los siguientes marcadores fluorescentes 5'HEX y 5'FAM (Macrogen Inc.) Las reacciones multiplex se configuraron de la siguiente manera: Grupo 1: EMFn182 5'FAM, EMFvi166 5'FAM, ARSFL11 5'HEX; Grupo 2: EMFv104 5'FAM, EMFn181 5'HEX, EMFn121 5'FAM; Grupo 3: EMFvi136 5'FAM, EMFn170 5'HEX, EMFn111 5'FAM, estas reacciones se configuraron como PCR

múltiple de punto final usando la T_a óptima para cada uno de los grupos. Una vez estandarizado el proceso de PCR, se analizaron quince individuos de cada una de las variedades de fresa evaluadas.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer; como marcador de peso molecular se usó Liz 500 Applied Biosystems, Foster City, CA; se usó un factor de dilución de cinco al momento de cargar los productos de PCR en el secuenciador. La lectura de los electroferogramas e identificación de alelos se hizo con el programa GeneMapper® versión 4.

Una vez identificados los alelos de cada una de las variedades se construyeron patrones alélicos a partir de donde se identificaron las diferencias en cuanto a número, tamaño y rango de amplificación para cada SSR. Posteriormente, con el análisis de las frecuencias alélicas, calculadas a partir de la matriz de presencia y ausencia elaborada con el paquete en Polysat bajo el ambiente R (Clark y Jasieniuk, 2011), se compararon las similitudes o diferencias en cuanto al patrón expresado en cada una de las variedades evaluadas. Para ello se usó el programa de análisis de dato INFOGEN/E, v. 2014. A partir de donde se obtuvo la matriz de distancias con dos coeficientes distintos, el de Jaccard (S_j) (Seath y Sokal, 1973) y el de DICE (S_D) (Dice, 1945) o de Nei-Li (1979). Estos coeficientes expresan la probabilidad de que un alelo en un individuo esté también en otro. A partir de estos se construyeron fenogramas con el programa NTSYSpc v. 2.10.

Como estimadores poblacionales se calcularon a partir de conteo directo de cada uno de los alelos obtenidos, los siguientes índices: índice de uniformidad de una población ($U_j = 1/m[\sum p_{ij}]$), índice de diversidad de una población ($H_j = -\sum p_{ij} \ln p_{ij}$), el polimorfismo de

la población media ($H_{pop} = 1/n \sum H_j = \sum p_{ij} \ln p_{ij}$) y el polimorfismo de la especie ($H_{sp} = - \sum p_i \ln p_i$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del proceso de estandarización en la extracción de DNA se obtuvo que el método Charge Switch Kit[®] tuvo calidades de entre 1.4 a 1.8 $DO_{260/280}$ y concentraciones de entre 150 a 192 $ng.\mu l^{-1}$. La metodología de CTAB tuvo calidades de entre 1.4 a 1.9 $DO_{260/280}$, sin embargo arrojó concentraciones muy variables de entre 37.8 $ng.\mu l^{-1}$ hasta 400 $ng.\mu l^{-1}$. La solución extractora DNAzol[®], presentó calidades fuera de los rangos permisibles por debajo de 1.3 $DO_{260/280}$ y por arriba de 1.9 $DO_{260/280}$, por tal motivo las muestras no son aptas para su amplificación, también tuvo concentraciones de ADN muy bajas de entre 17.3 $ng.\mu l^{-1}$, hasta 34 $ng.\mu l^{-1}$, debido a los lavados salinos que implica la metodología. En el cuadro 1 se puede observar un resumen de los datos obtenidos en cada una de las metodologías de extracción empleadas.

La calidad óptima para la amplificación de los SSR evaluados fue de 1.4 $DO_{260/280}$ (densidad óptica relación 260/280), hasta 1.8 $DO_{260/280}$, por debajo o arriba de este intervalo no se obtuvo amplificación alguna (Figura 1). Cabe destacar que Charge Switch Kit[®], fue totalmente automatizado debido a que la etapa de lavado se hizo con el robot de extracción diseñado para el mencionado kit de extracción; mientras que los métodos de CTAB y DNAzol[®], dependen de procesos manuales de precipitación y lavado (tiempos de incubación, decantados, numero de lavados), es en este punto donde se afecta la homogeneidad entre muestras del proceso de extracción y la obtención final del ADN.

Durante el proceso de amplificación de los micro satélites vía PCR se usó la metodología descrita por Sargent *et al.* (2003), misma que no produjo ningún evento de amplificación, ya que en su trabajo describió las condiciones de amplificación usando la técnica de PCR touch-down, donde las temperaturas de alineamiento se programan en un intervalo, bajando la temperatura a partir del punto de alineamiento óptimo, donde se parte de una temperatura menos permisiva para la amplificación a una más específica, asegurando que la amplificación se lleve a cabo

Cuadro 1. Concentración de ADN y densidad óptica de tres metodologías de extracción.

Muestra	DNAzol		Chargue Switch kit		CTAB	
	DNA (ng/μl)	DO (260/280)	DNA ng/μl	DNA (260/280)	DNA (ng/μl)	DO (260/280)
1*	29.1	1.3	192.0	1.4	37.8	1.4
2	33.9	1.3	180.9	1.4	150.7	1.5
3	30.9	1.3	181.3	1.5	62.0	1.7
4	17.3	2.9	147.0	1.6	51.5	1.4
5	24.9	2.3	181.1	1.8	462.0	1.9

*Cada muestra consto de tres repeticiones

. Bajo estas condiciones no se conoce la temperatura de alineamiento (Ta) ni el ciclo en que amplificó el primer (Oliveira *et al.* 2010). Por tal motivo en el presente trabajo se buscaron las temperaturas de alineamiento óptimas mediante PCR de punto final, presentadas en el Cuadro 2. En el mismo cuadro también se ve el número de picos y su tamaño expresado en pares de bases, en comparación con las observadas por otros autores, quienes probaron los SSR's en selecciones avanzadas y variedades diversas, obtenidas en sus respectivos programas de mejoramiento (Govan *et al.* 2008; Folta *et al.*

2010), donde se destaca que el peso molecular de los fragmentos amplificados se mantuvieron dentro de los límites reportados.

El número de alelos observados varió en comparación de los reportados; esto se debió al número y el tipo de accesiones usadas en cada estudio ya que la diversidad alélica de los marcadores SSR es mayor entre más accesiones se analicen (Yoon *et al.*, 2012).

Se encontraron un total de 63 alelos diferentes en las cinco accesiones probadas, cuadro 3, considerando los nueve SSR, el número de alelos amplificados varió de entre 3 y 12 alelos por cada SSR. Los marcadores que más alelos presentaron fueron el EMFn181 y el EMFv104, con 11 y 12, respectivamente. Según Govan *et al.* (2008), tan solo uno de estos dos SSR puede discriminar entre accesiones muy relacionadas. Todos los marcadores evaluados tuvieron un alto nivel de variabilidad y están distribuidos por todo el genoma del género *Fragaria*, lo que resultó en una huella única para cada accesión.

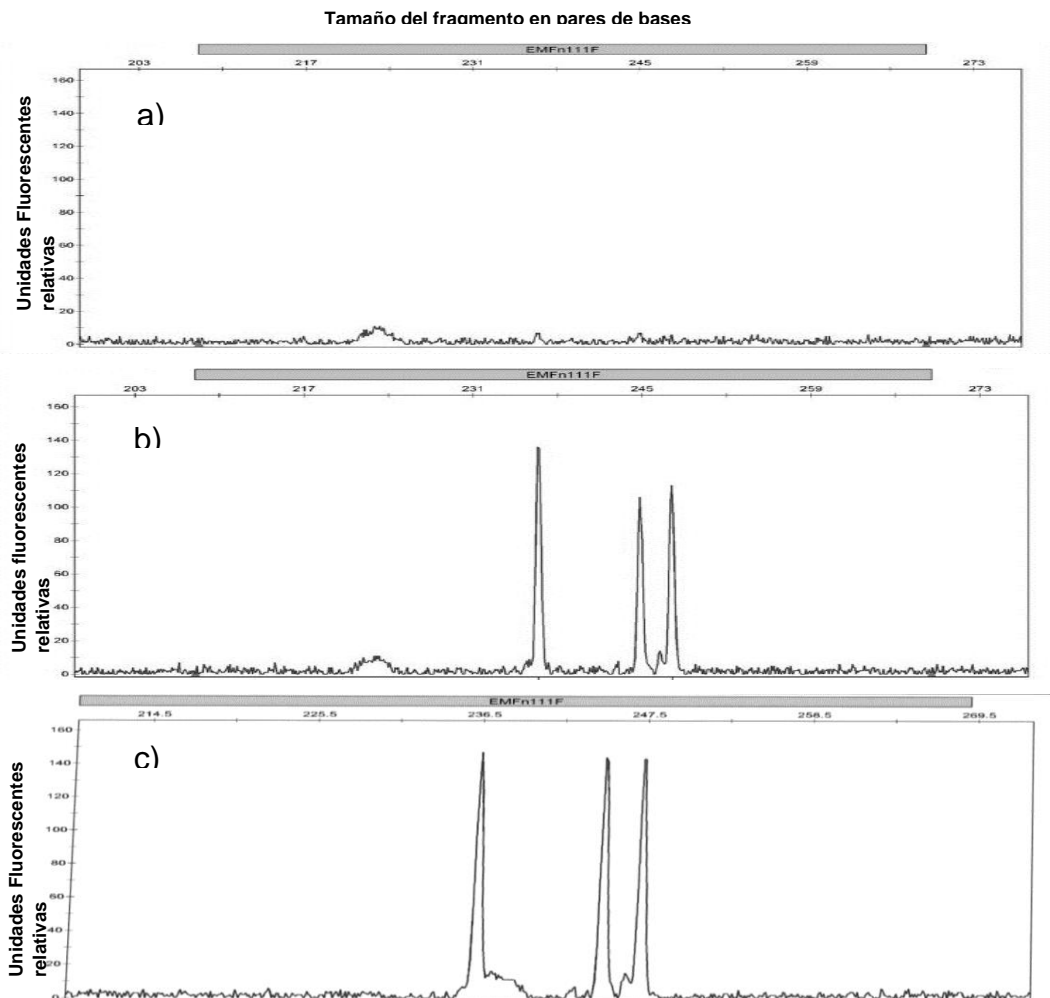


Figura 1. Prueba de amplificación de PCR del marcador EMFn111 en función de la calidad de DNA expresada en densidad óptica relación 260/280 ($DO_{260/280}$). Electroferograma elaborado con el programa GeneMapper®. a) $DO_{260/280}$; b) $1.4 DO_{260/280}$; c) $1.8 DO_{260/280}$.

Con los pesos moleculares expresados en pares de bases (pb) de cada alelo se crearon patrones alélicos de las accesiones por cada SSR (Cuadro 4). En los mencionados patrones se observa las diferencias entre accesiones en cuanto al tamaño y número de los fragmentos amplificados; estos datos sirven como base estándar a modo de comparar los resultados obtenidos en ensayos de identificación varietal del germoplasma aquí estudiado. Además, es un aporte a los procesos de estandarización de la técnica de PCR entre diferentes laboratorios y condiciones de trabajo.

Cuadro 2 . Temperaturas de amplificación, picos observados y tamaño de los fragmentos hallados en el presente estudio en comparación con estudios previos.

Primer	Locus	-----En el estudio -----			Brunings et al., 2010		Govan et al., 2008	
		*Ta	**PO	†Rango	‡POB	¶RB	×POG	××RG
		°C	No	Pb	No	Pb	No	Pb
1	ARSFL11	61.5	5	250 - 275	8	258-278	14	257-321
2	EMFN111	61.5	3	230 - 250	-	-	24	208-269
3	EMFn121	51.5	5	225-260	8	228-254	15	226-256
4	EMFn170	58	9	185-230	9	188-233	15	188-238
5	EMFn181	54.6	11	155-240	7	164-212	35	138-248
6	EMFn182	59.8	5	170-210	8	179-202	15	191-219
7	EMFv104	58.6	12	75-135	15	72-126	27	69-138
8	EMFvi136	59.8	7	130-170	8	132-160	18	111-188
9	EMFvi166	59.8	4	255-285	4	268-281	11	254-282

Nota: *Temperatura de amplificación; **Picos observados; †tamaño de los fragmentos; ‡Picos observados; ¶Rangos observados por Brunings et al, 2010; ×Picos observados; ××Rangos observados por Govan et al, 2008.

Las accesiones CP0201 y CP0204, proceden del mismo progenitor femenino, por lo cual están altamente emparentadas, situación que queda de manifiesto en su patrón alélico; sin embargo, las diferencias entre ellas se notan en los marcadores: EMFn182, EMFvi166, EMFn181. En un estudio presentado por (Brunings *et al*., 2010), reportó anteriormente la huella genética de la variedad Festival en Florida, , donde se analizó el mismo juego de marcadores moleculares. Las diferencias con la variedad Festival del Colegio de Postgraduados son las siguientes: cuatro marcadores (EMFvi166, EMFn121, EMFn170) tuvieron el mismo número de alelos, sin embargo tres SSR (ARSFL11, EMFn182, EMFvi136) expresaron alelos distintos, en cuanto al tamaño de los fragmentos encontrados. El SSR EMFn181 tuvo nueve alelos en el presente trabajo contra cuatro en el trabajo previo y el SSR EMFv104 presentó ocho alelos en comparación con seis del perfil de Florida, figura 2.

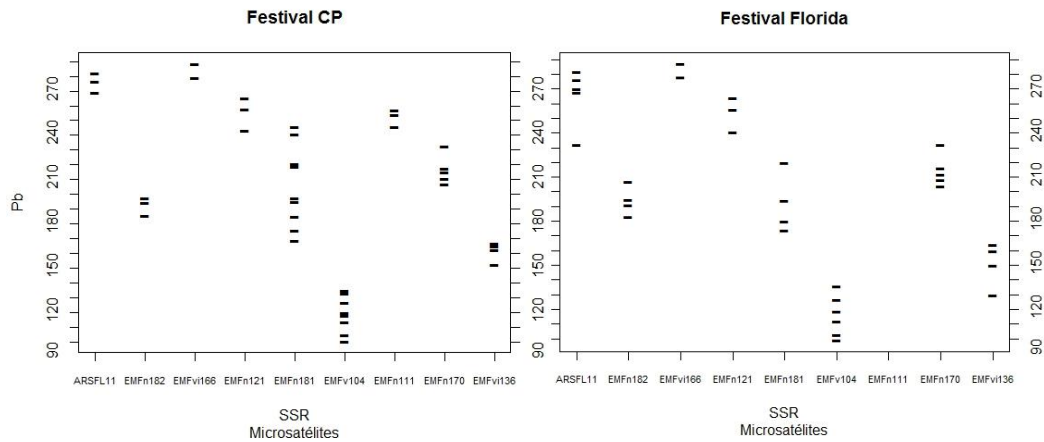


Figura 2. Comparativos entre patrón alélico de las variedades Festival mantenida en el Colegio de Postgraduados y la mantenida en Florida según Brunings *et al*, (2010). Gráficas obtenidas mediante R.

No obstante Brunings *et al*. (2010), encontraron en otras accesiones mayor cantidad de alelos con tamaños similares a los obtenidos en el presente estudio. Lo anterior puede indicar que la variedad Festival que aquí analizamos no es la misma a la que evaluó el mencionado autor, o que durante las etapas de multiplicación sufrió contaminación de otros materiales, generando algún tipo de variación.

En la Figura 4 se observan los patrones alélicos obtenidos para cada una de las accesiones evaluadas a partir de donde se puede comparar el patrón de bandeo para cada variedad.

Cuadro 3 . Número de alelos observados considerando todos los marcadores usados en las cinco accesiones evaluadas

	Alelos	*A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
ARSFL11		261	263	267	259	272							
EMFn182		176	185	188	198	190	191						
EMFvi166		278	271	278	269	260							
EMFn121		229	233	254	255	248							
EMFn181		166	172	175	185	188	211	218	231	159	209	236	
EMFv104		78	88	91	104	108	112	123	125	128	95	110	117
EMFN111		244	247	236									
EMFN170		187	193	197	201	208	223	225	216	205			
EMFvi136		134	143	153	155	161	163	157					

*Número de alelos identificado

Como resultado del análisis fenético, se tiene que las accesiones evaluadas se diferenciaron en función de su origen, de tal modo que tanto para el coeficiente de Jaccard como para el coeficiente de Dice se obtuvieron resultados similares cuando se calcularon las matrices de distancias fenéticas, los resultados de ambos se pueden observar en la Figura 3, donde se presentan los fenogramas que resultaron de cada uno de los coeficientes aplicados. Es importante resaltar que con el uso de ambos coeficientes el agrupamiento de las accesiones es la misma, en este tipo de fenogramas es posible hallar similitudes o diferencias entre las accesiones usando los datos de presencia y/o ausencia de alelos de la huella genética de las variedades de fresa que se usaron en el presente estudio. Las variedades CP0201 (Zamorana) y CP0204 (Jacona) tuvieron una huella genética muy similar, por situarse en la misma rama en el fenograma, y por tanto se confirma que están relacionadas, consultando los datos genealógicos de estas variedades, se tiene que ambas comparten el mismo progenitor femenino.

Las variedades CP0615, CPLE7 y Festival poseen un patrón alélico distinto en comparación con las variedades del Colegio de Postgraduados. Lo anterior ratifica lo mencionado por (Govan *et al.*, 2008), sobre el poder de discriminación de los micro satélites aquí empleados. En cuanto a los estimadores poblacionales calculados, se tuvo que el índice de uniformidad de una población (U_j) indica la distribución de cada uno de los alelos evaluados dentro de cada población, puede tomar valores de uniformidad alta ($U_j = 0$ ó $U_j = 1$) o uniformidad baja ($0 < U_j < 1$).

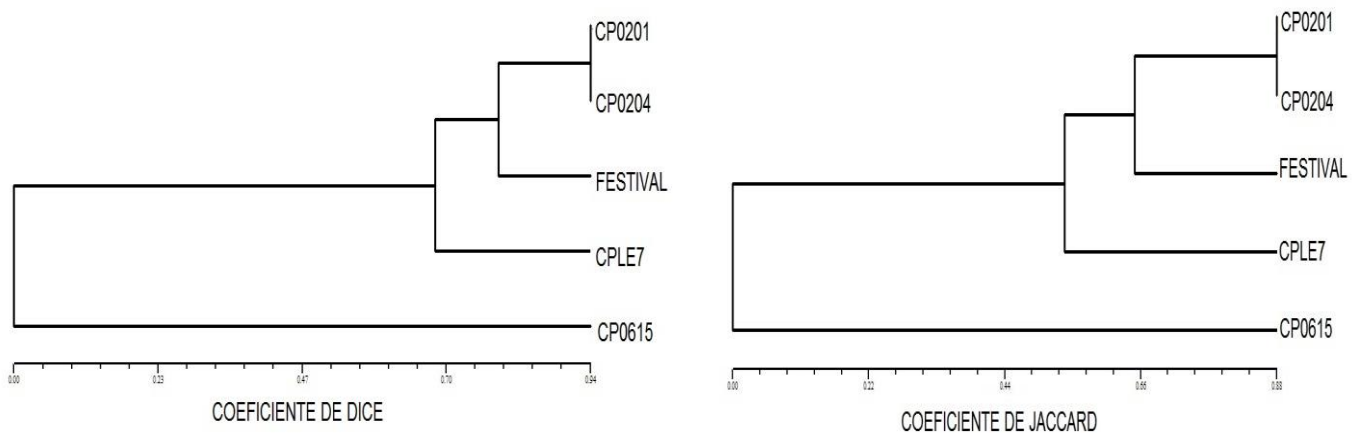


Figura 3. Fenogramas generados a partir de datos moleculares (SSR), resultados obtenidos del cálculo de matrices de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice (izquierda) y de Jacard (derecha)

Al estimar U_j en las variedades de fresa evaluadas, con los alelos derivados de SSR's, se tienen que las poblaciones presentaron un nivel de uniformidad bajo (cuadro 5). Esto se debió a la naturaleza polimórfica de los micros satélites, y el que más alelos presentó, tuvo hasta nueve alelos de distintos tamaños; dado que el número de alelos amplificados

por cada micro satélite cambia en función de las variedades evaluadas la uniformidad entre poblaciones indica que existen diferencias entre los alelos observados.

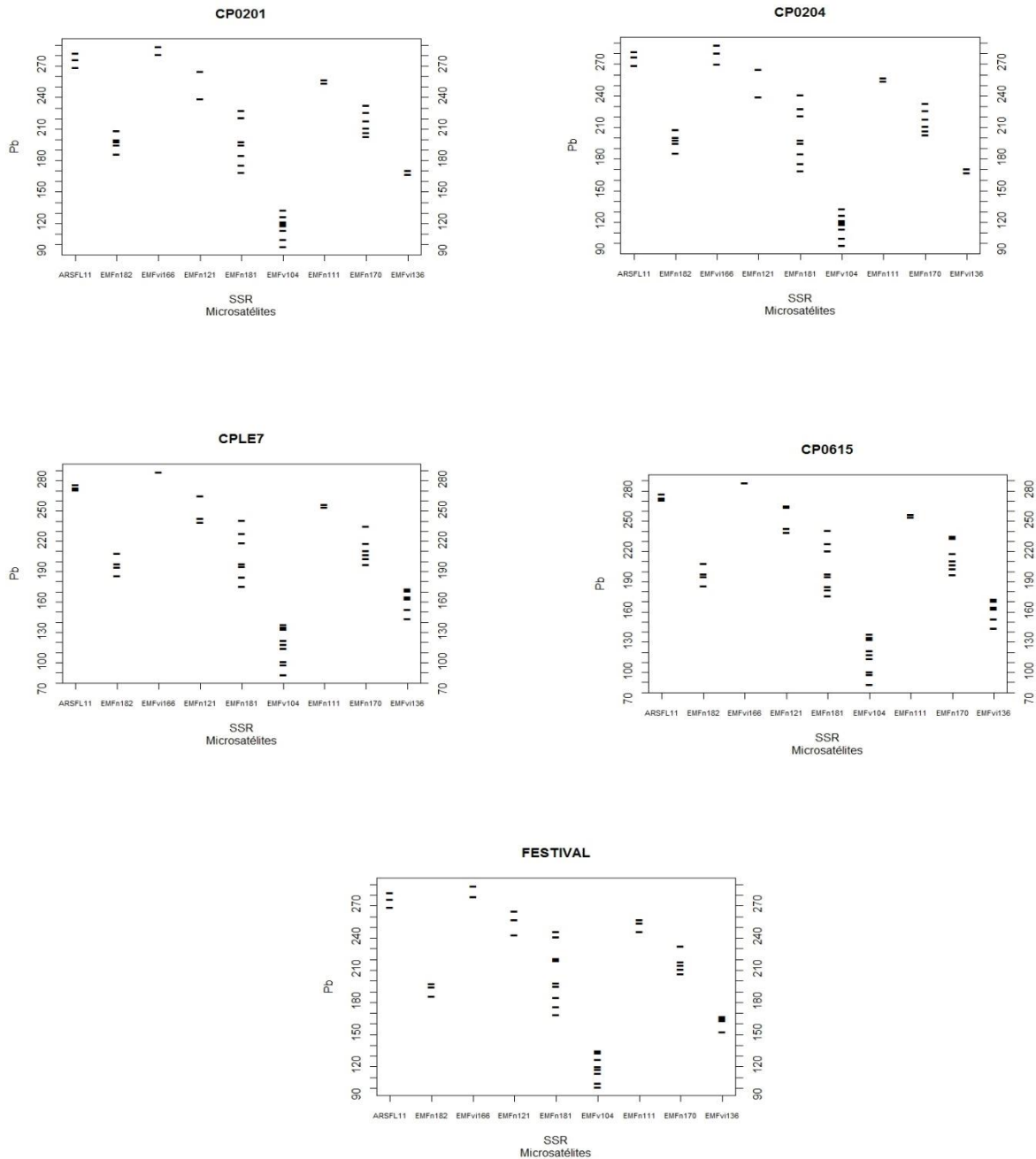


Figura 4. Geles virtuales elaborados a partir de los patrones alélicos de las accesiones evaluadas. Usando R v.3.1.2

En lo referente al índice de diversidad de una población (H_j), este mide el grado de entropía o grado promedio de incertidumbre en identificar a cuál categoría puede pertenecer un individuo escogido al azar de la colección. De esta manera las poblaciones que tuvieron mayor diversidad alélica fueron Festival, CPLE7 y CP0201 (Zamorana), con respecto a las restantes. En el Cuadro 5, se observan también el polimorfismo de la población media y el polimorfismo de la especie.

Cuadro 4 . Estimadores poblacionales de las variedades de fresa evaluadas

VARIEDAD	*U _j	**H _j	†H _{pop}	‡H _{sp}
CP0615	0.54	3.96	4.89	24.45
CP0201	0.46	5.10		
CP0204	0.50	4.32		
CPLE7	0.53	5.15		
FESTIVAL	0.49	5.93		

*Índice de uniformidad de una población; **Índice de diversidad de una población; †Polimorfismo de la población media; ‡Polimorfismo de la especie.

CONCLUSIONES

Con cada uno de los métodos de extracción de ADN evaluados se obtuvieron calidades y concentraciones óptimas para la amplificación de los SSR, la diferencia entre ellos radicó en la homogeneidad y repetitividad de los resultados debido a los procesos manuales de lavado, de tal manera que con el método automatizado Charge Switch kit[®], se obtuvieron resultados repetibles.

Se obtuvo el patrón alélico o huella genética de las variedades de fresa del Colegio de Postgraduados. Las diferencias entre variedades se expresaron en el número de alelos amplificados, así como en su tamaño, expresado en pares de bases. Con el set de nueve

marcadores SSR empleados y el patrón alélico que arrojaron se pudo evidenciar las similitudes entre las variedades CP0201 y CP0204, indicando su parentesco ya que comparten a su progenitor femenino. Se infiere que las variedades de CP0615 y CPLE7, tienen un patrón alélico diferente a las demás variedades evaluadas.

Cada uno de los patrones alélicos generados o huella genética se puede usar para asegurar la integridad genética de las variedades de fresa del Colegio de Postgraduados, en todos y cada uno de los procesos de multiplicación y producción de planta (*In vitro*, viveros y producción comercial).

BIBLIOGRAFÍA

- Arnau G., J. Lallemand, y M. Bourgoin , (2001) Are AFLP markers the best alternative for cultivar identification. *Acta Horticulturae* 546: 301-306. .
- Arnau G., J. Lallemand, y M. Bourgoin , (2002) Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129: 69-79. doi: 10.1023/A:1021509206584.
- Beovides Y., M. Fregene, A. Alves, J.P. Gutiérrez, C. Buitrago, J.A. Marin, M.D. Milián, S. Rodríguez, J.A. Cruz, E. Ruiz, D. Guerra, y H. Toledo , (2006) Análisis de diversidad genética mediante microsatélites (SSR) en cultivares del germoplasma cubano de yuca. *Plant Molecular Biology Reporter* 6: 9-14. .
- Brunings A.M., C. Moyer, N. Peres, y K.M. Folta , (2010) Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. *Euphytica* 173: 63-75. doi: 10.1007/s10681-009-0112-4.
- Carbone F., F. Mourgues, F. Biasioli, F. Gasperi, T.D. Märk, C. Rosati, y G. Perrotta , (2006) Development of molecular and biochemical tools to investigate fruit quality traits in strawberry elite genotypes. *Molecular Breeding* 18: 127-142. doi: 10.1007/s11032-006-9017-2.
- Carrasco B., M. Garc, G. Saud, y J.B. Retamales , (2007) The Chilean Strawberry [*Fragaria chiloensis* (L .) Duch .]: Genetic Diversity and Structure. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132: 501-506. .
- Clark L. V. y M. Jasieniuk , (2011) polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11: 562-566. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x.
- Congiu L., M. Chicca, y R. Cella , (2000) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology* 9: 229-232. .
- Dangl G., E. Lee, T. Susan, y A. Deborah , (2007) A new system for strawberry cultivar identification developed at Foundation Plant Services (FPS), University of California, Davis, using simple sequence repeat. *NASS/NASGA proceedings*, 118-121. .
- Debnath S.C., S. Khanizadeh, a. R. Jamieson, y C. Kempler , (2008) Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* 88: 313-322. doi: 10.4141/CJPS07088.
- Debnath S.C. y E. Ricard , (2009) ISSR , anthocyanin content and antioxidant activity analyses to characterize strawberry genotypes. *Journal of Applied Horticulture* 11: 83-89. .
- Degani C., L.J. Rowland, J.A. Saunders, S.C. Hokanson, E.L. Ogden, A. Golan-Goldhirsh, y G.J. Galletta , (2001) A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree

- data. *Euphytica* 117: 1-12. doi: 10.1023/A:1004008408435.
- Degani C., L. Rowland, J. A. Levi, J. Hortynski, A. y G. Galleta, J , (1998) DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 102: 247-253. .
- Folta K.M., M. a. Clancy, S. Chamala, A.M. Brunings, A. Dhingra, L. Gomide, R.J. Kulathinal, N. Peres, T.M. Davis, y W.B. Barbazuk , (2010) A Transcript Accounting from Diverse Tissues of a Cultivated Strawberry. *The Plant Genome Journal* 3: 90. doi: 10.3835/plantgenome2010.02.0003.
- Garcia M., M. Ontivero, C. Ricci, Diaz, J, y A. Castagnaro , (2002) Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Plant Breeding* 80: 76-80. .
- Gil-Ariza D.J., I. Amaya, J.M. López-Aranda, J.F. Sánchez-Sevilla, M. Ángel Botella, y V. Valpuesta , (2009) Impact of Plant Breeding on the Genetic Diversity of Cultivated Strawberry as Revealed by Expressed Sequence Tag-derived Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134: 337-347. .
- Gonzalez A. y X. Aguirre , (2007) Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). En: *Ecología Molecular* (Aguirre, L.E., Souza, V., y Aguirre, X., eds.) CONABIO, México Df, p. 567-572.
- Govan C.L., D.W. Simpson, a. W. Johnson, K.R. Tobutt, y D.J. Sargent , (2008) A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. x ananassa* cultivars. *Molecular Breeding* 22: 649-661. doi: 10.1007/s11032-008-9206-2.
- Graham J., R. McNicol, y J. McNicol , (1996) A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 402-406. .
- Hadonou A.M., D.J. Sargent, F. Wilson, C.M. James, y 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. .
- Han Z., C. Wang, X. Song, W. Guo, J. Gou, C. Li, X. Chen, y T. Zhang , (2006) Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 112: 430-9. doi: 10.1007/s00122-005-0142-9.
- Holleley C.E. y P.G. Geerts , (2009) Multiplex Manager 1.0: A cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* 46: 511-517. doi: 10.2144/000113156.
- Holton T.A., J.T. Christopher, L. McClure, N. Harker, y R.J. Henry , (2002) Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding* 9: 63-71. doi: 10.1023/A:1026785207878.
- Hussein T., A. Tawfik, y M. Khalifa , (2008) Molecular identification and genetic

- relationships of six strawberry varieties using ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Biology* 10: 677-680. .
- Hwang J., K. Jumsoon, S. Byeonggu, K. Kwanghwan, y P. Younghoon , (2011) Genetic diversity in watermelon cultivars and related species based on AFLPs and EST-SSRs. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39: 285-292. .
- Invitrogene , (2006) ChargeSwitch ® gDNA Plant Kit. User Manual. Version C. , 24 p. .
- Life Technologies , (2001) Plant DNA ZOL ® Reagent User Manual. *Gibco BRL*, 21-22. .
- Nantoumé a. D., S.B. Andersen, y B.D. Jensen , (2013) Genetic differentiation of watermelon landrace types in Mali revealed by microsatellite (SSR) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 60: 2129-2141. doi: 10.1007/s10722-013-9980-5.
- Novo M., S. Romo, M. Rey, M.J. Prado, y M.V. González , (2010) Identification and sequence characterisation of molecular markers polymorphic between male kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.) accessions exhibiting different flowering time. *Euphytica* 175: 109-121. doi: 10.1007/s10681-010-0192-1.
- Nunes F C., L. Ferreira J, C. Fernandes M, B. Souza De S, A. Leal G, B. Soares, D, M.S. Dias C, M. Pasqual, A. Borem, y G. Cancado M , (2011) Redalyc An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves Universidade Federal de Santa Maria An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves Otimização de um método para extração de DNA genômico a partir de folhas. *Ciencia Rural, Santa Maria*. 41: 1383 - 1389. .
- Oliveira E.C., A.T.A. Júnior, L.S.A. Gonçalves, G.F. Pena, S. Freitas Júnior, M. Ribeiro, y P. MG , (2010) Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting inter-simple sequence repeat markers in corn (*Zea mays*). *Genetic and Molecular Research* 9: 835-842. doi: 10.4238/vol9-2gmr767.
- Porebski S., L.G. Bailey, y B.R. Baum , (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15. doi: 10.1007/BF02772108.
- Powell W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, y A. Rafalski , (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238. doi: 10.1007/BF00564200.
- Rousseau-Gueutin M., E. Lerceteau-Köhler, L. Barrot, D.J. Sargent, A. Monfort, D. Simpson, P. Arús, G. Guérin, y 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: 2045-60. doi: 10.1534/genetics.107.083840.

- 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, y N.H. Battey , (2006) An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and applied genetics* 112: 1349-59. doi: 10.1007/s00122-006-0237-y.
- Sargent D.J., A.M. Hadonou, y D.W. Simpson , (2003) Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. *Molecular Ecology Notes* 3: 550-552. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00507.x.
- Seath A. y R.. Sokal , (1973) Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. *Systematic Zoology* 24: 263-268. doi: citeulike-article-id:2347143.
- Shimomura K. y K. Hirashima , (2006) Development and Characterization of Simple Sequence Repeats (SSR) as Markers to Identify Strawberry Cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 75: 399-402. .
- Tyrka M., P. Dziadczyk, y J.A. Horthyński , (2002) Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. *Euphytica* 125: 273-280. doi: 10.1023/A:1015892313900.
- Whitaker V. , (2011) Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research* 1: 115-127. doi: 10.3233/BR-2011-013.
- Yoon M.-Y., K.T. Moe, D.-Y. Kim, I.-R. Rho, S. Kim, K.-T. Kim, M.-K. Won, J.-W. Chung, y Y.-J. Park , (2012) Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 15: doi: 10.2225/vol15-issue2-fulltext-5.
- Zhang L., Z. Li, Y. Wang, Z. Jiang, S. Wang, y H. Huang , (2010) Vitamin C, flower color and ploidy variation of hybrids from a ploidy-unbalanced *Actinidia* interspecific cross and SSR characterization. *Euphytica* 175: 133-143. doi: 10.1007/s10681-010-0194-z.

CAPÍTULO III: SELECCIÓN DE LÍNEAS AVANZADAS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE FRESA EN EL COLEGIO DE POSTGRADUADOS

RESUMEN

Durante el ciclo 2013-2014 se germinaron aquenios de fresa provenientes de cruza a partir de progenitores élite, se evaluaron las plantas generadas durante cinco meses una vez que comenzaron a emitir estolones y frutos, las variables que se evaluaron fueron componentes del rendimiento, analizándolas mediante análisis de componentes principales, de donde se obtuvieron cuatro componentes principales, con tres de ellos se logró explicar el 98% de la variación, a partir de donde se seleccionaron 25 genotipos mediante selección individual. Con los genotipos seleccionados se generaron familias F2, obteniendo más aquenios que se germinaron y evaluaron en condiciones de campo, se obtuvieron un total de 1 559 plantas, evaluadas durante el ciclo de selección 2014-2015; las familias obtenidas se evaluaron durante un periodo de cinco meses, midiendo variables relacionadas con rendimiento, el procedimiento estadístico para escoger las plantas superiores fue análisis de componentes principales, de donde se obtuvieron seis componentes principales, con cuatro de ellos se logró explicar el 90% de la variación existente. Como resultado de la selección individual se seleccionaron 70 genotipos de distintas familias, mismos que se seguirán evaluando mediante la formación de familias clonales bajo distintas condiciones ambientales.

Palabras clave: Selección individual; componentes principales; fragaria x ananassa.

INTRODUCCIÓN

La fresa (*fragaria x ananassa*), de naturaleza octaploide es un cultivo de alto valor comercial en todo el mundo, la producción de fruto es de más del doble si se compara con la de otras frutillas combinadas (Stewart, 2012), por el mundo existen más de 100 programas de mejoramiento; para el año 2000 ya existían un total de 40 países con programas de mejoramiento, cuyas variedades fueron liberadas por 79 instituciones de educación pública y por 52 compañías privadas, (Community Plant Variety Office, 2014). Sobre todo se enfocaron a elevar las características agronómicas y de calidad de fruto tales como: sabor, textura, contenido de antioxidantes, producción prolongada y sobre todo una mayor vida post cosecha o de anaquel, (Govan *et al.*, 2008).

El fruto de la planta de fresa es muy apreciado y consumido por los habitantes de los países desarrollados situación evidente si se consultan las estadísticas de la FAO, (FAOSTAT, 2016), donde muestran que los principales países importadores de este fruto son: Estados Unidos de América, Canadá, Alemania, Francia y Rusia, mientras que los principales exportadores son: España, Estados Unidos de América, México, Bélgica e Italia. Esta situación sitúa al cultivo de la fresa como atractivo para la entrada de divisas al país, producto de la exportación de fruto, tanto en fresco como congelado.

En México la fresa se considera como un cultivo industrial y en algunos estados se cultiva de manera intensiva como en: Michoacán, Baja California, Guanajuato, Jalisco y el Estado de México. Un incentivo extra para fomentar el cultivo de la fresa es el alto precio, tan solo, en México alcanza los US\$ 897.73 por ton. (SIAP, 2014), equivalente a \$16 792.00 MN. ton⁻¹, según el tipo de cambio actual (\$ 18.87, pesos por dólar, Banxico, 2016).

Dada la importancia del cultivo en México, existe algunos programas de mejoramiento genético, donde se hacen esfuerzos de mejora mediante las técnicas tradicionales, como en el caso del Colegio de Postgraduados y el INIFAP (Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), de donde se han liberado variedades como Jaconá, Zamorana, Nikte y Pakal, sin embargo también instituciones como el CINVESTAV están incursionando en el uso de técnicas biotecnológicas en el proceso de mejoramiento.

La principal razón para la existencia de varios programas de mejoramiento alrededor del mundo es la pobre plasticidad fenotípica que expresa el cultivo de la fresa, ya que existe una importante interacción entre el genotipo y el ambiente donde se desarrolla, (Alm *et al.*, 2007; Bradford *et al.*, 2010). Lo anterior aunado a la preferencia de los consumidores, las exigencias de la industria, el mercado y de los mismos productores, hacen que la dinámica de generación de variedades sea muy activa, tanto en el sector público como privado (Lezzoni *et al.*, 2010).

De entre los caracteres más importantes durante el proceso de mejora de la fresa se encuentran: tamaño y número de frutos, estolonización, color externo e interno, y uniformidad de la producción. Cuando se desean mejorar características organolépticas a las selecciones avanzadas del programa se evalúan caracteres como: el contenido de sólidos solubles, la acidez titulable, los azúcares individuales y compuestos volátiles, (Whitaker *et al.* 2011). La mayoría de los programas de mejoramiento se basan en esquemas de apareamiento recombinante complementario, para tomar ventaja de los efectos no aditivos y de la actitud combinatoria específica, para después hacer selección en la progenie de cada cruce dirigida (Faedi *et al.* 2002).

El principal objetivo es incrementar el tamaño y la uniformidad de los frutos por planta, reduciendo el número de frutos de desecho, con frutos atractivos para el consumidor, y aumentando la eficiencia de cosecha (Whitaker, 2011). Con resultados de análisis de correlación se determinó que durante el proceso de selección y con la finalidad de incrementar el tamaño del fruto, se debe poner mayor atención a los siguientes caracteres: número de hojas, número de estolones por planta y número de frutos por planta, ya que estos tienen efectos positivos sobre los componentes de rendimiento de la fresa (Ara *et al.*, 2009).

Existen varias técnicas para discriminar la información morfológica colectada en campo para relacionarla con los efectos del ambiente o encontrar diferencias entre los caracteres estas son: enfoque de regresión lineal y los relacionados con parámetros de estabilidad (análisis de conglomerados, análisis de componentes principales, métodos geométricos y dominancia estocástica) (Westcott, 1986); y el análisis de componentes principales, considerado equivalente al método de regresión lineal, ya que la estimación de los mínimos cuadrados es equivalente a obtener los componentes principales de los datos colectados; y permiten dividir los genotipos en dos grupos, aquellos que muestren correlación positivas y aquellos que tengan correlaciones negativas con cada uno.

En el presente trabajo se evaluaron cruza F1 de fresa entre progenitores elite, además, se obtuvo la F2 de las selecciones de primer año para su evaluación en un segundo año, bajo el enfoque de componentes principales, con el objetivo de seleccionar plantas de fresa con mayor productividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Primer año de evaluación

El presente estudio se hizo bajo condiciones de campo abierto en Montecillos, Texcoco, México, a una altura de 2 500 msnm, donde se hicieron cruzas a partir de progenitores elite de donde resultaron 13 cruzas (cuadro 5); se obtuvieron aquenios a partir de la infrutescencia colectadas, a cada familia de semillas se les dio tratamiento con ácido sulfúrico al 80%, durante cinco minutos, después se enjuagaron con agua corriente, para lo cual se usó un cedazo y se limpió cada semilla para eliminar el pericarpio.

Después del tratamiento se germinaron las semillas en charolas redondas con un volumen de 5.5 dm³; el sustrato de germinación consistió en arena de río con una granulometría de 2 – 5 micras, regadas cada tercer día por inmersión, el proceso de germinación sucedió en mes y medio a partir de la siembra, al término de cuatro meses después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a vasos de unicel y cuando alcanzaron seis hojas, cuando pasaron seis meses después de la siembra, se trasplantaron a macetas de dos litros, con un sustrato constituido por una mezcla de tierra, agro lita y turba a razón de 1:1:1, la evaluación se desarrolló en las macetas, bajo condiciones de invernadero de cristal.

Las variables que se midieron fueron las siguientes: número de frutos, rendimiento total, peso de frutos y estolonización; el periodo de evaluación fue de cinco meses, una vez que las plantas comenzaron a producir frutos, en la temporada invernal. Con estos parámetros y mediante análisis de componentes principales usando el programa estadístico SAS, v. 9.2, se escogieron las plantas más productivas.

Cuadro 5. Cruzas de fresa evaluadas, durante el presente estudio

No	Cruza realizada
1	Tesoro x Festival
2	Zamorana x Albion
3	Jacona x Kristal
4	Zamorana x San Andreas
5	Zamorana x 1B6
6	Zamorana F2
7	Jacona F2
8	Festival x Kristal
9	Zamorana x Tesoro
10	Jacona x Chiflon
11	Jacona x Kristal
12	Zamorana x Fortuna
13	Tesoro x Festival

Segundo año de evaluación

A partir de las selecciones del primer año de evaluación, se obtuvieron semillas F2 de 23 familias seleccionadas, con la finalidad de fomentar la variabilidad de los caracteres evaluados en el primer año. A las semillas de cada familia se le dio tratamiento de etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico), a razón de 20 000 ppm en solución acuosa, para fomentar una germinación homogénea, ya que el ácido sulfúrico concentrado empleado el primer año de evaluación resultó en una baja tasa de germinación de las cruza realizadas.

Las semillas tratadas se sembraron en las charolas empleadas el primer año, pero en esta ocasión se empleó turba como sustrato de germinación, se le puso a la bolsa una cubierta plástica, para mantener la humedad constante, a los tres meses después de la siembra se trasplantó a charolas de germinación, cinco meses después de la siembra se trasplantó a campo, en surcos cubiertos con acolchado plástico.

La evaluación comenzó un año después de las siembras de la semilla y el periodo de evaluación tardó cinco meses, donde se midieron las variables, estolonización, número

de frutos por planta, peso y forma de fruto, además de tipo de inflorescencia. El análisis de los datos se hizo mediante análisis de componentes principales, con el programa estadístico SAS v. 9.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer año de evaluación

El análisis de componentes principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información o reducción de la dimensión del número de variables; las variables seleccionadas se agrupan en componentes principales o factores que son una combinación lineal de las variables originales y además son independientes entre sí, (Hair *et al.* 1995). Mediante esta técnica de análisis se pueden elaborar índices de selección, definido como una combinación lineal de los valores fenotípicos, que permiten separar genotipos con base en la evaluación simultánea de varios caracteres, (Sahagún-castellanos, 1996). El análisis de componentes principales se ha usado para estudios genéticos en tres maneras: como una herramienta para visualizar patrones de variación genética, para definir los parámetros que deben ser evaluados y para reducir el número de caracteres fenotípicos para después estimar sus parámetros genéticos, (Kirkpatrick y Meyer, 2004)

Mediante las funcionalidades del análisis de componentes principales y con la matriz de correlaciones se presentan a continuación los datos del primer año de evaluación de cruza entre progenitores élite de fresa. Se escogió la mencionada matriz de correlaciones debido a la naturaleza de las varianzas presentadas por los datos obtenidos, matriz que se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Matriz de correlaciones para las variables estolones, número de frutos, peso de fruto y rendimiento

	esto	nf	pf	rto
esto	1	0.0026	-0.0214	-0.0021
nf	0.0026	1	-0.1713	0.8498
pfs	-0.0214	-0.1713	1	0.2786
rto	-0.0021	0.8498	0.2786	1

esto = número de estolones; nf= número de frutos; pf= peso de fruto; rto = rendimiento por planta

Se obtuvieron cuatro componentes principales denominados fres 1, fres 2, fres 3, fres 4, que explican la variación de los datos evaluados, mismos que se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Componentes principales obtenidos durante el análisis

	fres1	fres2	fres3	fres4
esto	0.002033	0.201727	0.979433	0.003736
nf	0.691321	0.285138	0.059815	0.661206
pfs	0.094745	0.924553	0.189412	0.316778
rto	0.716306	0.15233	0.035456	0.680033

esto = número de estolones; nf= número de frutos; pf= peso de fruto; rto = rendimiento por planta

Del cuadro siete presentado anteriormente se escogieron los tres primeros componentes principales ya que estos explican un 98% de la variación de los datos evaluados. Solo se escogió el componente fres1, fres2 y fres3, el primero explica en un 71 % a la variable rendimiento (rto) y en un 69 % al número de frutos, lo que indica que estas dos variables tienen una relación directa; el segundo componente explica en un 92 % a la variable peso de fruto; mientras que el tercer componente explica en un 97 % a la variable estolones (esto). A partir de las combinaciones lineales independientes generadas durante el análisis de componentes principales se generaron diagramas bidimensionales donde se pueden observar la dispersión de cada uno de los genotipos evaluados.

En la Figura 5, se observa la relación entre los componentes principales fres 1 y fres 2, los números sobre cada uno de los puntos identifica el número de planta asignado durante el análisis. Los puntos que se observan en el primer cuadrante del gráfico representan a las plantas con un número de frutos y rendimiento altos, pero de igual manera un peso de frutos alto en comparación con las plantas que ocupan el tercer cuadrante donde se representa la relación inversa a lo anteriormente explicado. De manera general, en los cuadrantes dos y tres, se encuentran las plantas que tuvieron un valor alto, pero solo para una variable en particular. Cabe destacar que los componentes fres 1 y fres 2, presentaron un coeficiente de correlación de Pearson de cero lo que indica que las combinaciones lineales de las variables que representan dichos componentes no están correlacionadas.

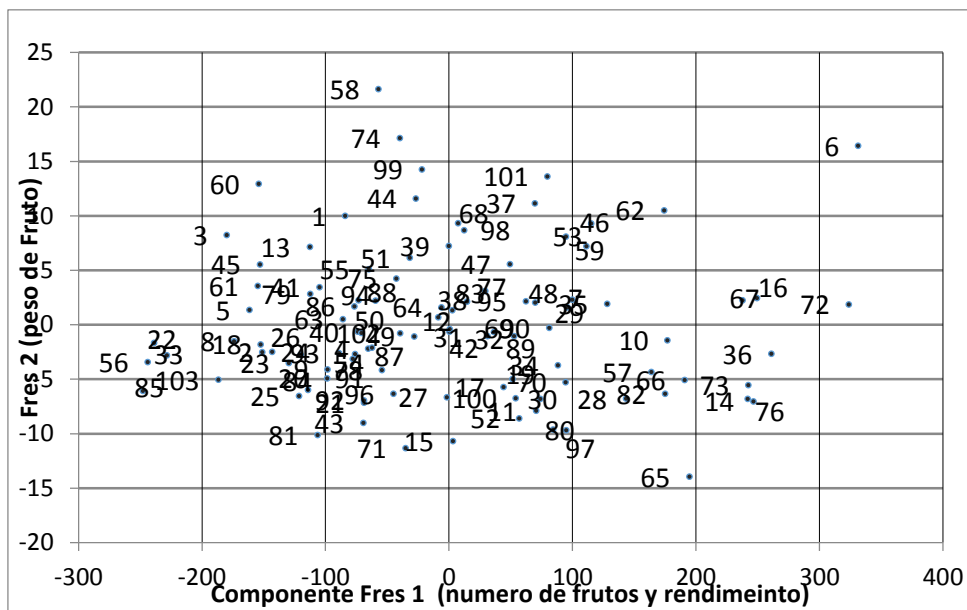


Figura 5. Puntos de dispersión de los componentes principales Fres 1 (productividad) y Fres 2 (peso de fruto), en el primer año de selección individual en fresa.

Bajo el mismo esquema de análisis se graficó el componente fres 1 (productividad) con fres 3 (estolones), (Figura 6); de este gráfico se puede deducir que la productividad de la planta expresada en número de frutos y rendimiento, es inversamente proporcional a la emisión de

estolones de la planta por tal motivo se deben escoger plantas que tengan un alto grado de productividad y emisión de estolones de moderada a baja.

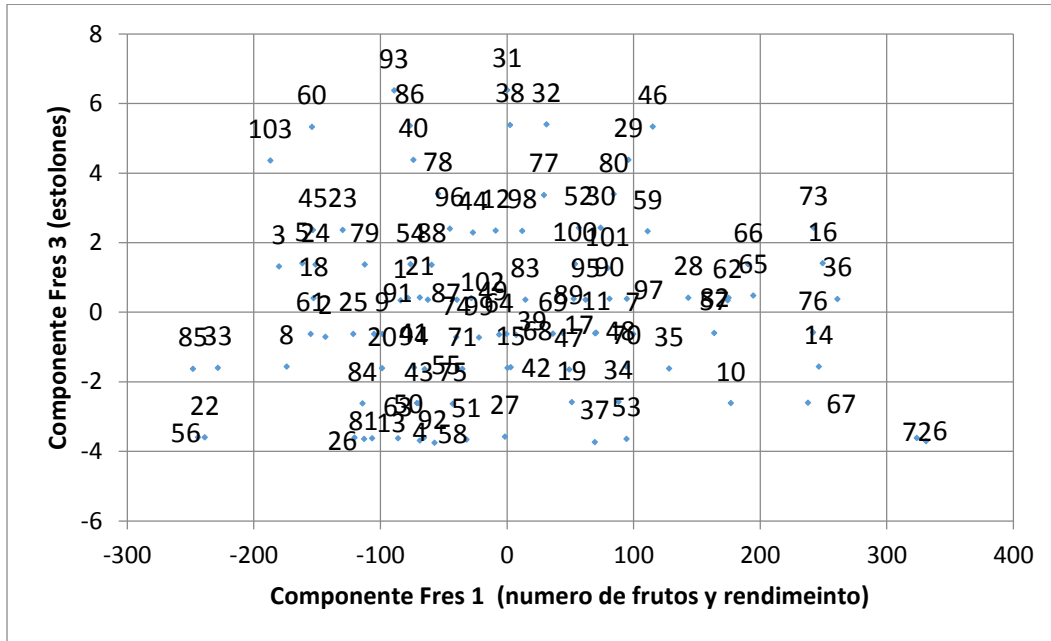


Figura 6. Dispersión de los componentes principales Fres1 (productividad) y Fres3 (estolonización), en el primer año de selección individual en fresa.

A partir del análisis de componentes principales se escogieron para el siguiente ciclo de selección a los individuos que expresan mayor productividad usando las combinaciones lineales generadas por el mismo ACP, de tal manera que los individuos seleccionados resultaran ser los que demostraron ser superiores bajo los términos de las variables medidas. En el Cuadro 8, se presenta una lista de los individuos seleccionados durante el primer ciclo de selección.

Cuadro 8. Plantas de fresa seleccionadas mediante análisis de componentes principales durante el primer ciclo de selección 2013-2014

Selección	No. referencia	No. de frutos	Peso por fruto (gr)	Rendimiento (gr)
CP-13-01	6	75	9.35	652.8
CP-13-02	7	42	10.64	423.2
CP-13-03	10	45	12.75	500.4
CP-13-04	14	45	13.65	570.1
CP-13-05	16	54	10.05	572.4
CP-13-06	29	41	10.81	419.6
CP-13-07	35	44	10.98	451.5
CP-13-08	36	51	14.5	584.3
CP-13-09	37	49	11.19	392.3
CP-13-10	46	50	8.95	438.1
CP-13-11	47	41	9.48	372.6
CP-13-12	48	39	9.64	393.5
CP-13-13	53	47	8.53	417.7
CP-13-14	59	48	10.5	434.3
CP-13-15	62	56	8.84	496.9
CP-13-16	67	53	10.51	560.8
CP-13-17	68	41	7.76	330.5
CP-13-18	69	34	11.25	360.3
CP-13-19	72	60	11.94	646.6
CP-13-20	73	46	12.97	566.1
CP-13-21	76	45	14.1	565.5
CP-13-22	77	37	10.17	352.9
CP-13-23	83	35	10.75	338.4
CP-13-24	90	38	11.29	404.8
CP-13-25	95	39	11.19	385.8

Segundo año de evaluación

En el siguiente ciclo de selección (2014-2015) se partió de las plantas escogidas en el primer año, a partir de donde se generó una población F2 de las selecciones de primer año; la evaluación procedió del mismo modo que en el primer año, cuyos resultados se presentan en las siguientes páginas.

El análisis de componentes principales se presenta a continuación (cuadro 9) la matriz de correlación de las variables evaluadas, de donde se obtuvieron las relaciones de las variables evaluadas.

Cuadro 9. Matriz de correlaciones para las variables tomadas en el segundo año de evaluación, ciclo 2014-2015

	No. De Frutos	Peso por fruto	Rendimiento	Forma de fruto	Tipo de Inflorescencia	Estolonización
No. De Frutos	1	0.3842	0.8367	0.3744	0.3278	0.2023
Peso por fruto	0.3842	1	0.6312	0.535	0.3628	0.063
Rendimiento	0.8367	0.6312	1	0.4023	0.3129	0.1793
Forma de fruto	0.3744	0.535	0.4023	1	0.4478	0.0349
Tipo de Inflorescencia	0.3278	0.3628	0.3129	0.4478	1	0.0226
Estolonización	0.2023	0.063	0.1793	0.0349	0.0226	1

Posteriormente se calcularon los componentes principales propios para los datos analizados, de donde resultaron seis componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables medidas, estos se presentan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Componentes principales obtenidos durante el análisis del ciclo de selección 2014-2015

	Componentes Principales					
	fresa1	fresa2	fresa3	fresa4	fresa5	fresa6
No. de Frutos	0.472	0.293	0.350	0.377	0.275	0.593
Peso por fruto	0.452	0.172	0.036	0.584	0.559	0.334
Rendimiento	0.514	0.223	0.385	0.041	0.104	0.725
Forma de fruto	0.413	0.343	0.306	0.330	0.707	0.096
Tipo de Inflorescencia	0.350	0.368	0.501	0.623	0.317	0.051
Estolonización	0.125	0.763	0.619	0.137	0.036	0.007

A partir de los valores calculados para cada componente principal se observó, que el componente fresa1, está altamente relacionado a la productividad con variables como

rendimiento, peso de fruto y número de frutos; el componente fresa2 está altamente relacionado con la estolonización; el componente fresa3 está altamente relacionado con el tipo de inflorescencia y la estolonización; el componente fresa4 está relacionado con el tipo de inflorescencia y el peso del fruto; el componente fresa5 está relacionado con la forma del fruto. De acuerdo a los resultados del análisis solo con considerar cuatro componentes principales se explica un 90% de la variación existente.

Como el principal objetivo de este estudio es seleccionar plantas de fresa con una productividad alta, se consideraron los tres primeros componentes principales y a partir del análisis de los gráficos de puntuaciones se procedió a seleccionar las plantas más productivas.

En el proceso de selección se tomó la decisión de usar solo los componentes relacionados con productividad y estolonización, ya que según, Ara *et al.*, (2009), tienen mayor efecto en los componentes del rendimiento. Mediante los componentes de rendimiento y estolonización se escogieron las mejores setenta plantas a partir de la Figura 7.

Cuadro 11. Plantas de fresa seleccionadas durante el ciclo 2015-2016

Selección de procedencia	Familia	Número de referencia (no)	Selección de procedencia	Familia	Número de referencia (no)
CP1301	H1	61	CP1315	H13	1005
CP1304	H3	316	CP1315	H13	1007
CP1305	H4	384	CP1315	H13	1008
CP1305	H4	386	CP1315	H13	1018
CP1306	H5	402	CP1315	H13	1033
CP1306	H5	419	CP1315	H13	1047
CP1307	H6	450	CP1315	H13	1053
CP1307	H6	455	CP1315	H13	1055
CP1309	H8	513	CP1317	H15	1087
CP1309	H8	518	CP1317	H15	1088
CP1309	H8	519	CP1317	H15	1097
CP1308	H7	532	CP1317	H15	1102
CP1308	H7	537	CP1317	H15	1110
CP1308	H7	546	CP1317	H15	1114
CP1307	H6	553	CP1317	H15	1117
CP1313	H11	697	CP1317	H15	1119
CP1313	H11	698	CP1317	H15	1120
CP1313	H11	704	CP1317	H15	1121
CP1313	H11	707	CP1317	H15	1122
CP1311	H9	733	CP1317	H15	1124
CP1313	H11	746	CP1317	H15	1125
CP1313	H11	770	CP1317	H15	1126
CP1312	H10	826	CP1317	H15	1128
CP1312	H10	874	CP1317	H15	1143
CP1312	H10	877	CP1317	H15	1147
CP1312	H10	884	CP1317	H15	1148
CP1317	H15	907	CP1317	H15	1150
CP1317	H15	910	CP1317	H15	1154
CP1317	H15	923	CP1317	h15	1201
CP1317	H15	925	CP1318	H16	1238
CP1317	H15	926	CP1318	H16	1239
CP1316	H14	939	CP1318	H16	1259
CP1316	H14	946	CP1324	H20	1425
CP1316	H14	956	CP1325	H21	1444
CP1316	H14	966	CP1319	H17	1475

CONCLUSIONES

El análisis de componentes principales resultó ser una herramienta fácil de implementar e interpretar al establecer una relación entre dos o más variables; En nuestro caso en particular resultó útil para discriminar las plantas de fresa con mayor productividad, puede ser usada como un complemento a la selección fenotípica hecha por el investigador y tener un punto de vista más objetivo. El proceso se realizó en dos ciclos de selección individual donde en el ciclo 2013-2014, resultaron 25 selecciones de fresa, mientras que en el ciclo 2015-2016, resultaron 70 selecciones que se pueden denominar de segundo año, mismas que serán evaluadas como familias clonales en la siguiente etapa del proceso de selección.

BIBLIOGRAFÍA

- Alm R., A. Ekefjård, M. Krogh, J. Häkkinen, y C. Emanuelsson , (2007) Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *Journal of Proteome Research* 6: 3011-3020. doi: 10.1021/pr0700450.
- Ara T., A. Haydar, H. Mahmud, K.. Khalequzzaman, y M.. Hossain , (2009) ANALYSIS OF THE DIFFERENT PARAMETERS FOR FRUIT YIELD AND YIELD CONTRIBUTING. *Int. J. Sustain. Crop Prod* 4: 15-18. .
- Bradford E., J.F. Hancock, y R.M. Warner , (2010) Interactions of Temperature and Photoperiod Determine Expression of Repeat Flowering in Strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135: 102 -107. .
- Community Plant Variety Office , (2014) *Annual Report 2014*. European Union, 2015, Italy.
- Faedi W., F. Mourgues, y C. Rosati , (2002) Strawberry breeding and varieties: Situation and perspectives. *Acta Horticulturae* 567: 51-59. .
- FAOSTAT, (2016) *Consulta web*. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Govan C.L., D.W. Simpson, a. W. Johnson, K.R. Tobutt, y D.J. Sargent , (2008) A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. x ananassa* cultivars. *Molecular Breeding* 22: 649-661. doi: 10.1007/s11032-008-9206-2.

- Kirkpatrick M. y K. Meyer , (2004) Direct estimation of genetic principal components: Simplified analysis of complex phenotypes. *Genetics* 168: 2295-2306. doi: 10.1534/genetics.104.029181.
- Lezzoni A., C.K. Weebadde, J.J. Luby, C. Yue, W.E. Van De Weg, G. Fazio, D. Main, C.P. Peace, N.V. Bassil, y J. McFerson , (2010) Enabling marker-assisted breeding in Rosaceae. *IS on Molecular Markers in Horticulture* 859: 359-394. .
- Sahagún-castellanos J.J.C.J. , (2005) A Selection Index Based on Principal Components. *Agrociencia* 39: 667-677. .
- Stewart P.J. , (2012) Strawberry: Part 4.1 *Fragaria* History and Breeding. En: *Genetics, genomics and breeding of berries*. (Folta, K.M., y Kole, C., eds.) Science Publishers, Clemtón, SC, USA, p. 199.
- Westcott B. , (1986) Some methods of analysing genotype—environment interaction. *Heredity* 56: 243-253. doi: 10.1038/hdy.1986.37.
- Whitaker V. , (2011) Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research* 1: 115-127. doi: 10.3233/BR-2011-013.
- Whitaker V.M., T. Hasing, C.K. Chandler, A. Plotto, y E. Baldwin , (2011) Historical trends in strawberry fruit quality revealed by a trial of university of Florida cultivars and advanced selections. *HortScience* 46: 553-557. .

CAPÍTULO IV: APTITUD COMBINATORIA DE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL RENDIMIENTO DE FRUTO EN FRESA, A PARTIR DE UN DISEÑO DIALÉLICO

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron por su capacidad como progenitores a siete variedades de fresa, pertenecientes a la colección de germoplasma del postgrado de fruticultura en el colegio de postgraduados; bajo un diseño de cruzamientos dialélico por el método II de Griffing. Se obtuvieron parámetros como la ACG, ACE, componentes de ACG y ACE, así como la heredabilidad en sentido amplio y estricto. Los caracteres evaluados fueron rendimiento total, peso por fruto y número de frutos por planta. Para el proceso de análisis estadístico se usó el software denominado, AGD-R, v 2.0, (Analysis of Genetics Designs, CIMMYT). Como resultado se obtuvo que en todos los caracteres evaluados la ACE tuvo mayor efecto que la ACG, por tanto los efectos génicos predominantes fueron los no aditivos, esta situación se reflejó de igual manera en la heredabilidad ya que la heredabilidad en sentido estricto, resultó baja en los rasgos medidos, mientras que la heredabilidad en sentido amplio fue mayor. Se concluye que las metodologías de selección apropiadas para estos caracteres son la recíproca recurrente y/o la hibridación.

Palabras clave: Dialélico, Aptitud combinatoria general (ACG), Aptitud combinatoria específica (ACE), heredabilidad, AGD-R.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de mejoramiento en cualquier especie es necesario contar con herramientas estadísticas de toma de decisiones, donde se analicen parámetros como la aptitud combinatoria general (ACG), aptitud combinatoria específica (ACE), efectos maternos (EM), efectos recíprocos (ER) y componentes de varianza; para ello se han usado de manera extensiva los diseños de cruza dialélicas, (Luna-spinoza, 2009). De tal manera que los sistemas de cruza dialélicas son los mecanismos de apareamiento más utilizados para eficientizar el proceso de mejoramiento genético; en un diseño típico se tienen un grupo de líneas auto fecundadas p , de donde se cruzan todos los genotipos entre sí, ya que estos permiten el conocimiento de las propiedades genéticas intrínsecas del material en estudio, el control genético de caracteres cuantitativos y permiten identificar progenitores y cruzamientos superiores, (Ruelas-Hernández *et al.*, 2008).

En este tipo de diseños existe un número máximo de cruza posible p^2 , mismas que se pueden dividir en tres grupos: i) un número p de autofecundaciones; ii) un grupo de F1's $[p(p-1)/2]$; iii) un grupo de $[p(p-1)/2]$ cruza recíprocas. Los métodos experimentales usados para analizar un diseño dialélico pueden variar en función de la presencia o de la inclusión de las autofecundaciones o de las cruza recíprocas F1's, en el diseño de cruzamientos. Existen cuatro métodos: i) donde se incluyen las autopolinizaciones, las cruza directas y recíprocas de la F1 (todas las combinaciones p^2); ii) se incluyen las autopolinizaciones y las cruza directas pero no las recíprocas, resultan las combinaciones $[p(p+1)/2]$; iii) se incluyen las cruza directas y las recíprocas, pero no se incluyen las autopolinizaciones, resultan $[p(p-1)]$ combinaciones; iv) se incluye las cruza directas pero no las recíprocas ni las autopolinizaciones, donde resultan $[p(p-1)/2]$ combinaciones, (Griffing, 1956a; Griffing, 1956b; Olfati *et al.*, 2012).

Cuando el número de progenitores es muy elevado, usualmente más de diez, se complica manejar una gran cantidad de cruzamientos, por tal motivo se crearon diseños dialélicos parciales, las cuales ensayan un subconjunto del total de las cruzas que es posible formar entre los progenitores básicos, siendo esta una herramienta más elástica para el genetista, estos experimentos pueden ser simétricos y asimétricos, los primeros requieren que cada progenitor involucre el mismo número de cruzas, mientras que el segundo requiere que uno de los progenitores tenga un número diferente de cruzas, (Luna-spinoza, 2009).

Mediante la información obtenida a partir de un diseño de cruzamientos dialélico, se obtiene el valor genético (breeding value) de los genotipos parentales, el cual es un dato esencial para el éxito de un programa de mejoramiento genético; este parámetro se puede deducir a partir de la aptitud combinatoria general y específica, para cada uno de los tratamientos evaluados, (Masny *et al.*, 2005).

La aptitud combinatoria general (ACG) de un progenitor para un rasgo en particular es definida como la media del valor de un carácter en una población de medios hermanos y sus padres; representa los efectos aditivos de los genes para este tratamiento y refleja la utilidad general de los parentales para producir nuevos cultivares. La aptitud combinatoria específica refleja como un par de parentales contribuyen a la expresión superior de un carácter en particular en la progenie híbrida. También es definida como la interacción entre un par de parentales para un carácter de la progenie y es un parámetro que determina los efectos no aditivos de los genes que contralan el carácter de interés, así como los efectos de dominancia y epistasis. La ACE puede variar ampliamente entre

pares de parentales de un programa de mejoramiento, (Masny *et al.*, 2005; Davik y Honne, 2005).

Para determinar qué efectos genéticos aditivos o no aditivos contribuyen más sobre un carácter en particular, se usa el coeficiente de las medias de la aptitud combinatoria elevada al cuadrado (S^2_{GCA} / S^2_{GCA}), cuando se analizan datos provenientes de un diseño de cruza dialélicas o de diseños de cruza factoriales, un coeficiente alto indica que son más importantes los efectos aditivos que los no aditivos en el carácter de interés, (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2003).

En el presente escrito se analizó un diseño de cruzamientos dialélicos 7x7, bajo el esquema del segundo método de Griffing, (1956a) y Olfati *et al.*, (2012) en el cultivo de fresa, escogiendo progenitores sobresalientes del programa de mejoramiento del colegio de postgraduados.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus, Montecillos, la primera etapa consistió en hacer una serie de cruzamientos bajo el esquema del método II de Griffing, cuadro 12, en condiciones de invernadero de cristal pertenecientes al postgrado de Fruticultura y la segunda etapa consistió en la evaluación en campo de los caracteres agronómicos se llevó a cabo en un lote experimental del campo San José, del postgrado de Fruticultura en el Colegio de Postgraduados.

Cuadro 12.. *Diseño de cruzamientos dialélico según el método 2 de Griffing, y los progenitores de fresa usados, donde: $[p(p+1)/2]$*

	CP-02-01	CP-02-04	ALBION	FESTIVAL	CPL7	CP-06-15	NIKTE
CP-02-01	X11	X21	X31	X41	X51	X61	X71
CP-0204		X22	X32	X42	X52	X62	X72
ALBION			X33	X43	X53	X63	X73
FESTIVAL				X44	X54	X64	X74
CPL7					X55	X65	X75
CP-06-15						X66	X76
NIKTE							X77

El germoplasma evaluado como progenitor se puede observar en el cuadro 1, entre ellos se encuentran dos variedades del Colegio de Postgraduados (CP0201 y CP0204), dos selecciones avanzadas CP0615 y CPL7, dos variedades comerciales Albión y Festival, y una variedad liberada por el INIFAP, llamada Nikte. Las variables que se evaluaron fueron las asociadas al rendimiento de fruto entre ellas el rendimiento expresado en gr.pl¹, el peso por fruto en gramos (gr) y el número de frutos por planta.

La primera etapa consistió en las siguientes actividades: i) selección de los progenitores; ii) cruzamiento; iii) Colecta de frutos y extracción de semilla (aquenios); iv) tratamiento para germinación de los aquenios; v) germinación; vi) etapa de plántula. Duración 7 meses.

La segunda etapa consistió en: i) preparación del terreno (rastreado, surcado y acolchado); ii) trasplante; iii) evaluación. Duración: 9 meses.

El análisis de los datos del diseño de cruzamientos dialélico propuesto por Griffing (1956), método dos modelos uno de efectos fijos, se ejecutó con el procedimiento propuesto por Rodríguez et al, (2015), mediante el software denominado AGD-R, v 2.0, (Analysis of

Genetics Designs, CIMMYT). Cuyo modelo al evaluarse en un solo ambiente se expresa a continuación:

$$y_{ijk} = \mu + \text{REP}_k + \text{gca}_i + \text{sca}_{ij} + e_{ijk}$$

donde:

y_{ijk} es el valor observado

μ es la media

REP_k es el efecto de repeticiones ($k= 1;2;\dots;r$)

gca_i es el efecto paterno ($i=1;2;\dots;p$)

sca_{ij} es el efecto materno ($i= 1;2;\dots;p$ y $j= 1;2;\dots;p$)

e_{ijk} es el efecto del error

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de varianza

En lo referente al análisis de varianza derivado de los resultados del diseño de cruzas dialélicas se observó que los efectos de la crusa para los caracteres rendimiento, peso de fruto y números de frutos por planta, resultaron ser altamente significativos ($p \leq 0.01$); mientras que los efectos de ACG y ACE, resultaron también ser altamente significativos ($p \leq 0.01$), en la prueba de F derivada del análisis de varianza. Estos resultados sugieren que los caracteres evaluados están influenciados por la acción génica aditiva como no aditiva.

Al analizar la relación ACG/ACE, se tiene que para rendimiento y número de frutos resultó de mayor importancia la ACG, mientras que en el peso de fruto tuvo mayor peso la ACE, como se observa en el cuadro 13. Según Ruelas-Hernández *et al.*, (2008), cuando la mayor proporción de la relación mencionada favorece a la ACG, es más importante la acción génica aditiva, por lo que las metodologías de mejoramiento por selección son

más efectivas, mientras que cuando la relación favorece a la ACE, cobra mayor importancia la acción génica no aditiva, por lo que es más apropiado usar metodologías de mejoramiento mediante hibridación.

Cuadro 13. Relación ACG/ACE, para tres caracteres asociados a rendimiento en Fresa

Rendimiento	Peso de fruto	Número de fruto
1.34	0.53	1.97

Aptitud combinatoria general (ACG)

En lo que se refiere a la aptitud combinatoria general, se tuvo que para la variable rendimiento los progenitores con mayor ACG, fueron CP0201, CP0204, Festival y CPLE7; en el peso de fruto los progenitores que sobresalieron fueron CP0201 y Festival; mientras que para número de frutos destacaron CP0201, CPLE7 y CP0615. Solo CP0201 y Festival coincidieron en ACG más alta en al menos dos caracteres evaluados, Cuadro 14. Tomando en cuenta que la ACG es un parámetro que expresa la acción génica aditiva del carácter de interés y que en términos más simples es la desviación de la media con respecto a los demás cruces, entonces este parámetro muestra el potencial de los progenitores para transmitir algunas de sus características a sus descendientes, (Olfati *et al.*, 2012), por tales motivos y de acuerdo a los resultados mostrados para ACG, se tuvo que los efectos aditivos no son de importancia para los caracteres evaluados.

Cuadro 14. Efectos de aptitud combinatoria general (ACG) en tres caracteres asociados al rendimiento en fresa

Progenitor	Rendimiento	Peso de fruto	Número de frutos
CP0201	13.07	1.68	1.11
CP0204	6.44	0.30	0.23
ALBION	1.12	0.23	0.01
FESTIVAL	6.42	1.54	0.19
CPLE7	7.91	0.39	0.60
CP0615	4.58	0.34	0.44
NIKTE	1.71	0.45	0.10

Aptitud combinatoria específica (ACE)

En el cuadro 15, se presentan los efectos de aptitud combinatoria específica para los caracteres evaluados, en él se observa la craza que obtuvo el valor más alto para este parámetro en cada uno de los caracteres evaluados, es de importancia mencionar que la craza con mayor valor absoluto de ACE, es la que fue superior con respecto a las otras cruzas. Para el rendimiento las cruzas que presentaron ACE alta en comparación con las demás fueron ALBION x CP0204, FESTIVAL x ABION, CPLE7 x FESTIVAL, y NIKTE X CP0204. Para el caso del peso de fruto las cruzas con alta ACE fueron NIKTE x CP0201, y ALBION x CP0204. Para el número de frutos las cruzas con mayor ACE fueron NIKTE x CP0204, ALBION X CP0204, y FESTIVAL x ALBION. Considerando que cada craza en particular tiene un valor esperado mismo que es la suma de la aptitud combinatoria general de los parentales, y que cuando este valor esperado se desvía en mayor o menor medida es llamado aptitud combinatoria específica, entonces se tiene que el dato obtenido de este último parámetro mencionado representa la familia que tuvo un comportamiento superior para el carácter en cuestión.

Cuadro 15. Efectos de la aptitud combinatoria específica (ACE) para componentes de rendimiento en fresa.

Rendimiento						
	CP-0204	ALBION	FESTIVAL	CPLE7	CP-06-15	NIKTE
CP-02-01	-5.96	-4.86	-6.94	0.93	2.06	5.52
CP-0204		43.28	0.68	9.19	9.13	28.38
ALBION			19.52	-14.14	5.72	-3.42
FESTIVAL				18.29	3.55	-16.08
CPLE7					-1.62	17.64
CP-06-15						11.69
Peso de Fruto						
	CP-0204	ALBION	FESTIVAL	CPLE7	CP-06-15	NIKTE
CP-02-01	-0.09	-1.44	-0.59	1.23	1.74	11.32
CP-0204		3.80	0.28	2.30	2.97	1.18
ALBION			2.87	-2.47	3.15	-0.27
FESTIVAL				2.84	1.32	-2.20
CPLE7					-0.65	1.61
CP-06-15						0.47
Numero de Frutos						
	CP-0204	ALBION	FESTIVAL	CPLE7	CP-06-15	NIKTE
CP-02-01	-0.40	-0.12	-0.75	-0.42	-0.40	-0.69
CP-0204		1.69	0.32	0.91	0.36	2.23
ALBION			1.24	-0.33	0.26	-0.03
FESTIVAL				1.05	0.15	-1.13
CPLE7					0.06	1.16
CP-06-15						0.73

Componentes de ACG, ACE y heredabilidad

Mediante el análisis de los componentes de ACG y ACE, se puede inferir el tipo de efectos que son más importantes en los caracteres que se evaluaron, en el presente trabajo estos parámetros se presentan en el cuadro 16. en cada uno de los rasgos mencionados la ACE tuvo valores más altos que la ACG, lo que indica la importancia de los efectos génicos no aditivos, en los rasgos evaluados. Como se registró un efecto mayor de la

ACE, se tiene las metodologías de selección apropiadas para continuar con el mejoramiento de estos caracteres son mediante un programa de selección recurrente recíproca o por medio de hibridación (de la Cruz-Lazáro *et al.*, 2010).

Cuadro 16. Componentes de ACG, ACE y Heredabilidad para tres caracteres en fresa

Rasgo o Carácter	ACG	ACE	GCA/SCA	Heredabilidad en sentido estricto	Heredabilidad en sentido amplio
Rendimiento	56.19	377.20	0.15	0.09	0.38
Peso de fruto	0.94	16.31	0.06	0.04	0.35
Número de Frutos	0.31	1.40	0.22	0.10	0.32

Según Moreno-Maldonado *et al.*, (2002), la heredabilidad es una de las propiedades más importantes de un carácter, pues expresa la proporción de la varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes. La heredabilidad en sentido estricto determina el grado en que los fenotipos de los individuos están determinados por los efectos de los genes transmitidos por los progenitores a sus descendientes y está directamente relacionada a los efectos génicos aditivos; cabe resaltar que esta fue la razón por la que en el presente estudio se tuvieron heredabilidades en sentido estricto bajas ya que sobre los caracteres se tiene poca influencia de los efectos aditivos sobre el fenotipo expresado en las progenies evaluadas.

Por otro lado, la heredabilidad en sentido amplio resulta del cociente de la varianza genotípica sobre la varianza fenotípica, en la primera involucra además de los efectos de la varianza aditiva, las varianzas de dominancia y de interacción epistática, es decir los efectos génicos no aditivos, mismos que tienen efecto principal sobre los caracteres que se evaluaron en el presente trabajo.

Cuando se tienen heredabilidades en sentido estricto son bajas no se puede aprovechar algún efecto aditivo, por lo tanto, la respuesta a la selección será baja en cada ciclo de selección.

CONCLUSIONES

Todos los caracteres evaluados tuvieron bajos efectos génicos aditivos, esto fue así debido a que son componentes del rendimiento, por lo tanto, tuvieron una ACE alta y una baja ACG, por tales motivos se recomienda seguir un programa de selección recurrente recíproca o mediante hibridación; lo anterior se refleja en las bajas heredabilidades en sentido estricto que se presentaron.

Las progenies de los progenitores que resultaron con alta ACE, son los que fueron superiores en los caracteres evaluados, por tanto, se puede continuar el proceso de selección en ellas por la elevada ACE, de sus progenitores.

BIBLIOGRAFÍA

- Davik J. y B.I. Honne , (2005) Genetic variance and breeding values for resistance to a wind-borne disease [*Sphaerotheca macularis* (Wallr. ex Fr.)] in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) estimated by exploring mixed and spatial models and pedigree information. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 256-264. doi: 10.1007/s00122-005-2019-3.
- Griffing B. , (1956)(a) A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31-50. .
- Griffing B. , (1956)(b) Concept of General and Specific Combining Ability in Relation to Diallel Crossing Systems. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 463-493. doi: doi:10.1071/BI9560463.
- de la Cruz-Lazáro E., G. Castañón-Najera, N.P. Brito-Manzano, A. Gómez-Vázquez, V. Robledo-Torres, y A.J. Lozano del Río , (2010) Heterosis y aptitud combinatoria de poblaciones de maíz tropical. *Phyton* 79: 11-17. .
- Lagunes-Espinoza L.C., C. Huyghe, y J. Papineau , (2003) Genetic inheritance of proportion of pod walls and other yield components in white lupin. *Euphytica* 131: 305-311. doi: 10.1023/A:1024006802562.
- Luna-spinoza I. (2009) Mejor predictor lineal e insesgado familiar de aptitud combinatoria general en experimentos parciales de cruas dialélicas con efectos maternos* best linear unbiased familiar predictor for partial diallel experiments with maternal effects. *Agricultura Técnica en México* 35: 245-256. .
- Masny A., W. Madry, y E. Zurawicz , (2005) Combining ability analysis of fruit yield and fruit quality in ever-bearing strawberry cultivars using an incomplete. *Journal of Fruit and Ornamental plant Researchlant Research* 13: 5-17. .
- Moreno-Maldonado M., A. Peña-Lomelí, J. Sahagún-Castellanos, J.E. Rodríguez-Pérez, y R. Mora-Aguilar , (2002) VARIANZA ADITIVA, HEREDABILIDAD Y CORRELACIONES EN LA VARIEDAD M1-Fitotecnia DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot). *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 231-237. .

Olfati J. a, H. Samizadeh, B. Rabiei, y G. Peyvast , (2012) Griffing's methods comparison for general and specific combining ability in cucumber. *TheScientificWorldJournal* 2012: 524873. doi: 10.1100/2012/524873.

Ruelas-Hernández P.G., F. de J. Caro-Velarde, R. Valdivia-Bernal, y P.-G. R. , (2008) APTITUD COMBINATORIA Y HETEROSIS EN UN CRUZAMIENTO DIALÉLICO EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L .). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 325-330 .