

Universitat Politècnica de València  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio  
Natural  
Grado en Biotecnología



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado

**IMPLEMENTACIÓN DE UN SET DE  
MARCADORES MICROSATÉLITES PARA LA  
DIFERENCIACIÓN DE VARIEDADES DE  
*FRAGARIA X ANANASSA***



Curso académico 2017-2018

Autora: Eva Bataller Perelló

Tutora: Dra. Magdalena Cervera Ocaña

Tutora UPV: Dra. M<sup>a</sup> Belén Picó Sirvent

València, 18 de junio de 2018

# IMPLEMENTACIÓN DE UN SET DE MARCADORES MICROSATÉLITES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE VARIEDADES DE *FRAGARIA X ANANASSA*

## Resumen

La fresa cultivada (*Fragaria x ananassa*) es una fruta de alto valor económico de la que existen más de mil variedades en todo el mundo. Para mantener la importancia del cultivo, evitar la dependencia de material foráneo y adaptarse a las necesidades del mercado y del consumidor, se están obteniendo nuevas variedades de fresa mediante programas de mejora. Con el fin de defender los derechos del obtentor sobre las variedades generadas y poder diferenciar debidamente unos genotipos de otros, se han desarrollado marcadores moleculares que permiten evaluar adecuadamente el contenido genético de cada variedad. En el presente trabajo se han seleccionado y utilizado un set de marcadores moleculares microsátélites para realizar la diferenciación de variedades de fresa y se ha comparado su eficacia con los resultados obtenidos para las mismas variedades con los marcadores RAPD e ISSR. Se ha estudiado la transferibilidad del mismo set de microsátélites en frambuesa (*Rubus idaeus*), ya que es de la misma subfamilia que la fresa cultivada. Además, se ha evaluado la asociación de los microsátélites a caracteres agronómicos de interés comercial como la firmeza del fruto y el día corto. Finalmente, se ha hecho una revisión bibliográfica de los posibles proyectos que se podrían llevar a cabo de cara al futuro para reforzar el desarrollo de estudios genéticos en la empresa Valgenetics S.L.

**Palabras clave:** marcadores moleculares, microsátélites, *Fragaria x ananassa*, diferenciación varietal, selección asistida por marcadores, caracteres agronómicos

**Autora del Trabajo Final de Grado:** Eva Bataller Perelló

**Localidad y fecha:** Valencia, junio de 2018

**Tutora académica:** Dra. Magdalena Cervera Ocaña

# **IMPLEMENTATION OF A SET OF MICROSATELLITE MARKERS TO DIFFERENTIATE *FRAGARIA X ANANASSA* VARIETIES**

## **Abstract**

Cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) is a high economic value horticultural crop from which there are more than one thousand varieties around the world. To maintain the relevance of the crop, to avoid the dependence on foreign material and to be adapted to the market and customer needs, new strawberry varieties are being developed through breeding programs. With the aim of defending breeder's rights in the obtained varieties and to differentiate appropriately the genotypes among them, molecular markers have been generated to evaluate accurately the genetic content of each variety. In this project, a set of microsatellite molecular markers has been selected and used to carry out the varietal differentiation of cultivated strawberry and the efficacy of the markers has been compared with the results obtained for the same varieties with RAPDs and ISSR markers previously used. The transferability of microsatellites in raspberry (*Rubus idaeus*) has been studied since it belongs to the same subfamily as cultivated strawberry. Furthermore, the association of microsatellites with agronomical traits of commercial interest such as fruit firmness and short-day have been tested. Finally, it has been done a bibliographic revision about possible future projects to strengthen the development of genetics studies in Valgenetics S.L.

**Key words:** molecular markers, microsatellites, *Fragaria x ananassa*, varietal differentiation, marker assisted selection, agronomical traits

**Student:** Eva Bataller Perelló

**Place and date:** Valencia, June 2018

**Academic tutor:** Dra. Magdalena Cervera Ocaña

# IMPLEMENTACIÓ D'UN SET DE MARCADORS MICROSATÈL·LITS PER A LA DIFERENCIACIÓ DE VARIETATS DE *FRAGARIA X ANANASSA*

## Resum

La fresa cultivada (*Fragaria x ananassa*) és una fruita d'alt valor econòmic de la que existeixen més de mil varietats a tot el món. Per a mantindre l'importància del cultiu, evitar la dependència de material forani i adaptar-se a les necessitats del mercat i del consumidor, s'estan obtenint noves varietats de fresa mitjançant programes de millora. Amb l'objectiu de defensar els drets de l'obtentor sobre les varietats generades i poder diferenciar adequadament uns genotips dels altres, s'han desenvolupat marcadors moleculars que puguin permetre l'avaluació del contingut genètic de cada varietat. En aquest treball s'han seleccionat i s'ha utilitzat un set de marcadors moleculars microsatèl·lits per a realitzar la diferenciació de varietats de fresa cultivada i s'ha comparat la seua eficàcia amb els resultats obtinguts per a les mateixes varietats amb marcadors RAPDs i ISSR. S'ha estudiat la transferibilitat del set de marcadors desenvolupats en altres cultius com el gerd (*Rubus idaeus*), ja que és de la mateixa subfamília que la fresa cultivada. A més, s'ha avaluat l'associació dels microsatèl·lits amb caràcters agronòmics d'interés comercial com la fermesa del fruit i el dia curt. Finalment, s'ha realitzat una revisió bibliogràfica dels possibles projectes de cara al futur que podria realitzar l'empresa Valgenetics S.L per a reforçar el desenvolupament d'estudis genètics.

**Paraules clau:** marcadors moleculars, microsatèl·lits, *Fragaria x ananassa*, diferenciació varietal, selecció assistida per marcadors, caràcters agronòmics

**Autora del Treball Final de Grau:** Eva Bataller Perelló

**Localitat i data:** València, juny de 2018

**Tutora acadèmica:** Dra. Magdalena Cervera Ocaña

## AGRADECIMIENTOS

*A Magda Cervera por su predisposición, su gran dedicación y por hacerme sentir tan a gusto en el día a día.*

*A María R. Albiach por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y a su equipo por ayudarme cuando lo he necesitado.*

*A mi madre por apoyarme y ayudarme en todo lo que he necesitado, a mi padre por motivarme a adentrarme en el mundo de la ciencia, a mi hermana por la alegría que me transmite cada día y a mis abuelos por su optimismo.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. EL GÉNERO <i>FRAGARIA</i> Y ESPECIES DE FRESA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. ESTRUCTURA MORFOLÓGICA DE LA PLANTA</b>	<b>1</b>
<b>1.3. IMPORTANCIA SOCIAL Y ECONÓMICA</b>	<b>2</b>
<b>1.4. MECANISMOS DE REPRODUCCIÓN Y NECESIDAD DE OBTENCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN VARIETAL</b>	<b>3</b>
<b>1.5. TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES</b>	<b>4</b>
1.5.1. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)	5
1.5.2. Secuencia entre repeticiones simples (ISSR)	6
1.5.3. Microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR)	6
1.5.4. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	7
<b>1.6. TRANSFERIBILIDAD DE MARCADORES MOLECULARES ENTRE CULTIVOS</b>	<b>7</b>
<b>1.7. MEJORA GENÉTICA VEGETAL</b>	<b>8</b>
1.7.1. Mejora genética de características agronómicas: firmeza del fruto	9
1.7.2. Mejora genética de características agronómicas: variedades de día corto, remontantes y de día neutro	9
1.7.3. Mejora genética de resistencias a plagas o enfermedades	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<b>3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL</b>	<b>12</b>
<b>3.2. EXTRACCIONES Y CUANTIFICACIONES DEL ADN</b>	<b>12</b>
<b>3.3. CONTROL: AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA ACTINA Y SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS</b>	<b>12</b>
<b>3.4. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES RAPD E ISSR</b>	<b>13</b>

<b>3.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES</b>	<b>14</b>
3.5.1. Marcadores microsatélites utilizados para la diferenciación varietal	14
3.5.1.1. Selección de los marcadores microsatélites	14
3.5.1.2. Amplificación de los marcadores SSR y separación de los productos obtenidos	15
3.5.1.3. Amplificación multiplexada de los microsatélites	16
3.5.2. Marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos	16
<b>3.6. AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO (<i>CLUSTERING</i>)</b>	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>18</b>
<b>4.1. DIFERENCIACIÓN VARIETAL EN FRESA</b>	<b>18</b>
4.1.1. Marcadores RAPD	18
4.1.2. Marcadores ISSR	22
4.1.3. Amplificación individual de los marcadores microsatélites en fresa	25
4.1.4. Amplificación multiplexada de los marcadores microsatélites en fresa	25
<b>4.2. DIFERENCIACIÓN VARIETAL EN FRAMBUESA</b>	<b>29</b>
4.2.1. Marcadores ISSR	29
4.2.2. Amplificación individual de los marcadores microsatélites en frambuesa	30
4.2.3. Amplificación multiplexada de los marcadores microsatélites en frambuesa	30
<b>4.3. MEJORA ASISTIDA POR MARCADORES</b>	<b>32</b>
4.3.1. Marcadores asociados a caracteres agronómicos en fresa	32
4.3.2. Estudio de variedades resistentes a enfermedades	33
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>1</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Morfología general de una planta de fresa.

**Figura 2.** Resumen de los efectos en la salud de las fresas.

**Figura 3.** Producción de fresa mundial y de los principales países productores a partir de 1986 (por décadas).

**Figura 4.** Esquema de las condiciones de PCR empleadas en la amplificación del gen de la actina.

**Figura 5.** Esquema de las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los marcadores RAPD e ISSR.

**Figura 6.** Esquema de las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los marcadores microsatélites para la diferenciación varietal.

**Figura 7.** Esquema de las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos.

**Figura 8.** Dendrograma obtenido combinando los resultados de los marcadores RAPD en fresa.

**Figura 9.** Dendrograma obtenido combinando los resultados de los marcadores ISSR en fresa.

**Figura 10.** Electroferograma obtenido tras la amplificación multiplexada de los microsatélites en fresa.

**Figura 11.** Dendrograma obtenido con los marcadores microsatélites en fresa.

**Figura 12.** Dendrograma obtenido con los marcadores ISSR en frambuesa.

**Figura 13.** Electroferograma obtenido tras la amplificación multiplexada de los marcadores microsatélites en frambuesa.

**Figura 14.** Dendrograma obtenido con los marcadores microsatélites en frambuesa.

**Figura 15.** Dendrograma obtenido tras la amplificación de marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Comparación de las técnicas principales que involucran marcadores bioquímicos y moleculares para identificar la diversidad genética.

**Tabla 2.** Origen de las variedades analizadas.

**Tabla 3.** Composición de la PCR utilizando los cebadores para la amplificación del gen de la actina.

**Tabla 4.** Secuencia de los cebadores de los marcadores RAPD e ISSR.

**Tabla 5.** Composición de la PCR utilizando los marcadores RAPD e ISSR.

**Tabla 6.** Especie a partir de la cual se obtuvieron los marcadores, referencia bibliográfica, número de alelos y porcentaje de polimorfismo de los microsatélites.

**Tabla 7.** Tamaño de banda esperado y fluoróforo de los marcadores microsatélites.

**Tabla 8.** Composición de la PCR utilizando los marcadores microsatélites.

**Tabla 9.** Característica agronómica asociada al marcador, tamaño de alelo esperado, fluoróforo y temperatura de hibridación del cebador.

**Tabla 10.** Fenotipos de las variedades analizadas.

**Tabla 11.** Resultados obtenidos con los marcadores de tipo RAPD en fresa.

**Tabla 12.** Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores RAPD en fresa.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos con los marcadores de tipo ISSR en fresa.

**Tabla 14.** Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR en fresa.

**Tabla 15.** Rango del tamaño de los alelos obtenidos por los microsatélites en fresa.

**Tabla 16.** Resultados obtenidos con el conjunto multiplexado de microsatélites en fresa.

**Tabla 17.** Comparación del número de alelos obtenidos en cada uno de los marcadores respecto a los identificados en la bibliografía consultada.

**Tabla 18.** Matriz de similitud obtenida tras los resultados de la electroforesis capilar de los marcadores microsatélites en fresa.

**Tabla 19.** Resultados obtenidos con los marcadores de tipo ISSR en frambuesa.

**Tabla 20.** Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR en frambuesa.

**Tabla 21.** Rango del tamaño de los alelos obtenidos por los microsatélites en frambuesa.

**Tabla 22.** Resultados obtenidos con el conjunto multiplexado de microsatélites en frambuesa.

**Tabla 23.** Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores microsatélites en frambuesa.

**Tabla 24.** Matriz de similitud obtenida con los marcadores microsatélites relacionados a caracteres agronómicos.

**Anexo: Tabla 1.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores RAPD en fresa.

**Anexo: Tabla 2.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR1 e ISSR2 en fresa.

**Anexo: Tabla 3.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR3 e ISSR4 en fresa.

**Anexo: Tabla 4.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (I).

**Anexo: Tabla 5.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (II).

**Anexo: Tabla 6.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (III).

**Anexo: Tabla 7.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (IV).

**Anexo: Tabla 8.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR1 e ISSR2 en frambuesa.

**Anexo: Tabla 9.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR3 e ISSR4 en frambuesa.

**Anexo: Tabla 10.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en frambuesa.

**Anexo: Tabla 11.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con los marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Dioxirribonucleico
<b>AFLP</b>	(Amplified Fragment Length Polymorphism) Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
<b>AP-PCR</b>	(Arbitrarily Primed PCR) Reacción en cadena de la polimerasa iniciada al azar
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CAPS</b>	(Cleaved amplified polymorphic sequences) Secuencia de restricción amplificada y polimórfica
<b>cM</b>	Centimorgan
<b>C.S.</b>	Coefficiente de similitud
<b>DAF</b>	(DNA Amplified Polymorphic) Amplificación de la huella de ADN
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleótidos
<b>GDR</b>	Genome Database for <i>Rosaceae</i>
<b>EST</b>	(Expressed Sequence Tag) Marcador de secuencia expresada
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FEPEX</b>	Federación Española de Asociación de Productores Exportadores
<b>F.</b>	<i>Fragaria</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>ISSR</b>	(Inter-Simple Sequence Repeats) Secuencia entre repeticiones simples
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>MAS</b>	(Marker Assisted Selection) Selección asistida por marcadores
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1
<b>PB</b>	Bandas polimórficas
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	(Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa

<b>PP</b>	(Primer peak) Pico del cebador
<b>QTL</b>	(Quantitative Trait Locus) Locus de caracter cuantitativo
<b>RAPD</b>	(Random Amplified Polymorphic DNA) Polimorfismo de ADN amplificado al azar
<b>RFLP</b>	(Restriction Fragment Length Polymorphism) Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
<b>SCAR</b>	(Sequence Characterized Amplified Region) Región amplificada caracterizada por una secuencia
<b>S.I.</b>	Sin información sobre el origen
<b>S. L.</b>	Sociedad Limitada
<b>SNP</b>	(Single Nucleotide Polymorphism) Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>SSR</b>	(Single Sequence Repeat) Repeticiones de secuencia simple
<b>TC</b>	Colesterol total
<b>TFA</b>	Número total de fragmentos amplificados
<b>TG</b>	Triglicérido
<b>U</b>	Unidad
<b>UPGMA</b>	(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Método de pares no ponderados usando medias aritméticas.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL GÉNERO *FRAGARIA* Y ESPECIES DE FRESA

*Fragaria x ananassa* Duch., llamada comúnmente fresa, es un cultivo de gran importancia económica de la familia *Rosaceae*, distribuido mundialmente y del que actualmente existen más de mil variedades.

Los análisis filogenéticos dividen la familia *Rosaceae* en tres subfamilias: *Dryadoideae*, *Rosoideae* y *Spiraeoideae*. La subfamilia *Dryadoideae* contiene el género *Prunus*, en el que se encuentran cultivos importantes como la cereza, la ciruela, la almendra, la pera, la nectarina y el albaricoque; la subfamilia *Spiraeoideae*, que abarca los géneros *Malus* y *Pyrus*, en los que se hallan los cultivos de la manzana y la pera; y por último, la subfamilia *Rosoideae*, que es la más importante económicamente, donde se incluyen el género *Rosa*, en el que es de especial importancia el cultivo de las rosas y plantas ornamentales, *Rubus* en el que destaca la frambuesa (*Rubus idaeus*) y el género *Fragaria* en el que se encuentra la fresa (Potter et al., 2007).

Existen veinticinco especies en el género *Fragaria*, todas ellas contienen siete cromosomas ( $x=7$ ) y los niveles naturales de ploidía varían de diploides a decaploides. Hay seis niveles de ploidía conocidos en la especie *Fragaria*: diploide ( $2n=2x=14$ ), tetraploide ( $2n=4x=28$ ), pentaploide ( $2n=5x=35$ ), hexaploide ( $2n=6x=42$ ), octoploide ( $2n=8x=56$ ) y decaploide ( $2n=10x=70$ ) (Njunga et al., 2013).

Concretamente, la fresa cultivada (*Fragaria x ananassa*) es una especie octoploide ( $2n=8x=56$ ), que se obtiene mediante la hibridación natural de dos especies de fresa, *F. chiloensis*, originaria de Chile, y *F. virginiana*, proveniente de América del Norte (Hancock et al., 2010).

## 1.2. ESTRUCTURA MORFOLÓGICA DE LA PLANTA

La fresa cultivada es una especie hortícola de tipo herbáceo, perenne y de porte rastrero. Presenta un sistema radicular fasciculado, compuesto por raíces y raicillas. Las primeras presentan un cambium vascular y suberoso, mientras que las segundas carecen de este, son de color más claro y tienen un periodo de vida corto.

La profundidad del sistema radicular es variable, dependiendo entre otros factores del tipo de suelo y la presencia de patógenos en este. En condiciones óptimas puede alcanzar los 2 o 3 m, aunque lo normal es que no sobrepase los 40 cm (López, 2009).

El tallo está constituido por un eje corto de forma cónica llamado corona, en el que se observan numerosas escamas foliares. De esta corona nacen los estolones, a partir de los cuales brotan nuevas plantas.

Las hojas se insertan en la corona y se disponen en roseta, presentan un largo peciolo y están provistas de dos estípulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos con un gran número de estomas ( $300-400$  estomas/ $\text{mm}^2$ ), pediculados y de bordes aserrados (López, 2009).

La flor de la fresa cultivada es hermafrodita y las inflorescencias se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona o de yemas axilares de las hojas. Suele tener 5 o 6 pétalos, de 20 a 35 estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso.

Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto de tipo aquenio. El desarrollo de los aquenios, distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso, estimula el crecimiento y la coloración de este, dando lugar al fruto, comúnmente llamado fresón. Los frutos son pequeños aquenios de color oscuro dispuestos sobre el engrosamiento del receptáculo, su forma y tamaño son una característica varietal, aunque se ven influenciados por la posición en la inflorescencia y otros factores ambientales (López, 2009).

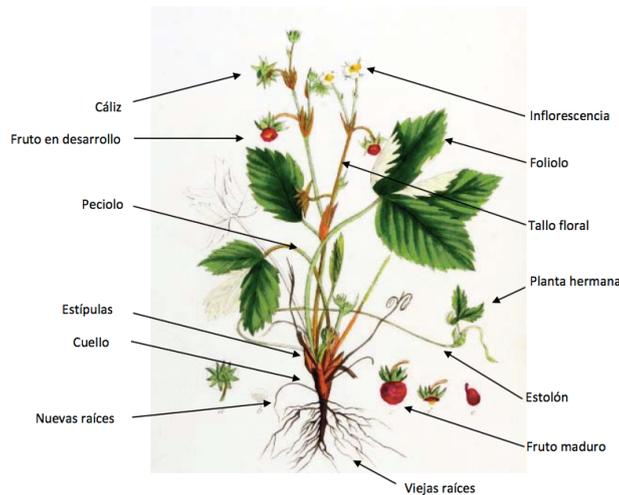


Figura 1. Morfología general de una planta de fresa. Extraído de Kops et al. (1844).

### 1.3. IMPORTANCIA SOCIAL Y ECONÓMICA

La fresa se caracteriza por un sabor y aroma muy particular, es una fuente rica en polifenoles, vitamina C, antioxidantes, fibra alimentaria soluble e insoluble de buena calidad dietética y hierro (Hannum, 2004; Zafra-Stone et al., 2007). Además, los pigmentos antociánicos y los taninos hidrolizables y no hidrolizables son muy interesantes para la salud, porque poseen cualidades antiinflamatorias, cardioprotectivas, antimetabólicas, antiobesidad, antimicrobianas, neuroprotectoras, antidiabéticas, anticáncer y antioxidantes (Afrin et al., 2016).

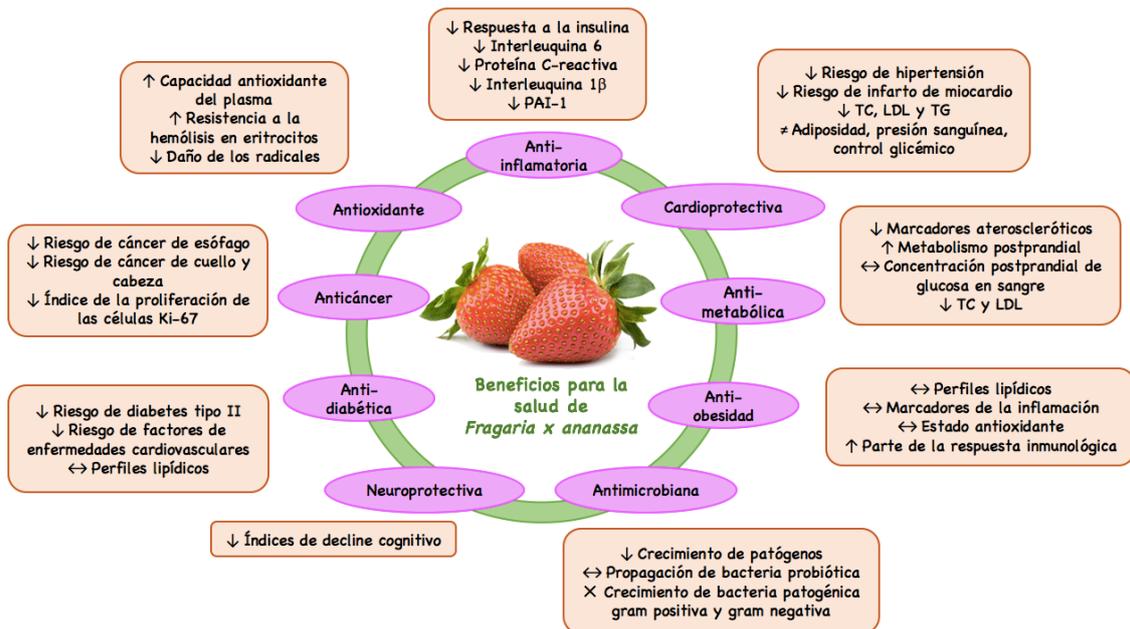
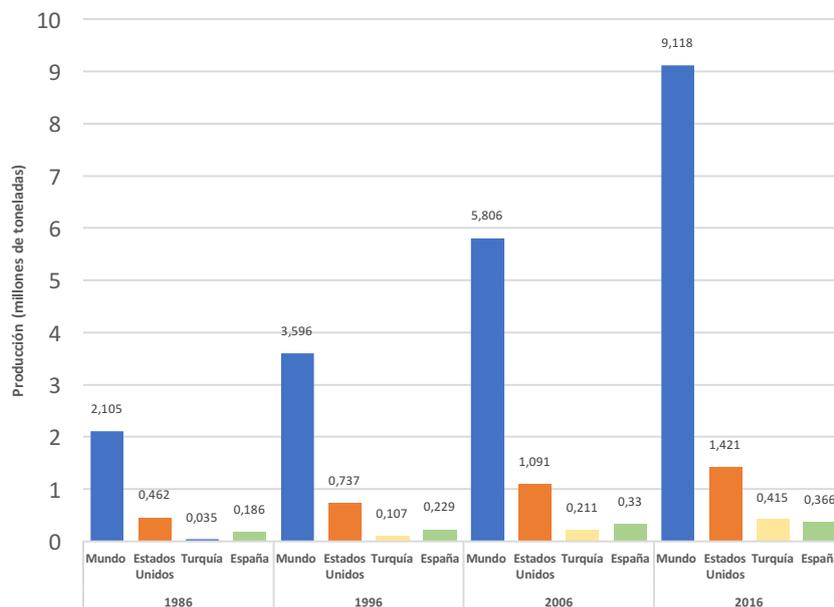


Figura 2. Resumen de los efectos en la salud de las fresas. El símbolo (↔) indica la normalización del efecto, (↓) reducción de la actividad, (↑) aumento de la actividad, (X) supresión de la actividad y (≠) sin efecto. La sigla PAI significa inhibidor del activador del plasminógeno, TC, colesterol total, LDL, lipoproteína de baja densidad y TG triglicéridos. Basado en una figura de Afrin et al. (2016).

Todo esto hace que la fresa cultivada sea el fruto rojo de mayor producción mundial, la cual ha ido creciendo de forma considerable año tras año hasta alcanzar la cifra de 9.118.336 de toneladas en 2016 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2016).

España es el tercer país en niveles de producción, con una producción en 2016 de 366.161 miles de toneladas, siendo Estados Unidos el país con una mayor producción mundial de fresa (alrededor de 1,4 millones de toneladas) (FAO 2016).



**Figura 3.** Producción de fresa mundial y de los principales países productores a partir de 1986 (por décadas).

Respecto al área cultivada de fresas, en 2016 en España fue de 7650 ha (FAO, 2016), más del 95% de las cuales se encuentran en la provincia de Huelva, donde las condiciones ambientales son particularmente adecuadas para el cultivo intensivo de fresa (Zorrilla-Fontanesi et al., 2010). Cabe resaltar el impacto económico mundial del mercado de la fresa, con una facturación en 2014 de alrededor de 11 mil millones de dólares, de los que España aporta aproximadamente 600 millones (FAO, 2014; FEPEX, 2014). Por ello, España es el primer país exportador mundial, con aproximadamente el 20% de las exportaciones de fresa mundiales (FAO, 2014).

Por último, debido a la similitud en las propiedades y la composición nutricional entre la fresa cultivada y la frambuesa, éste último cultivo ha ido aumentando su importancia en el mercado. España se ha consolidado como el octavo país productor mundial de frambuesa superando las 17 mil toneladas en el año 2016 (FAO, 2016) y el área cultivada en España ha crecido desde 37 ha en 1995 a 1801 ha en 2016 (FAO, 2016), es decir, actualmente es casi cincuenta veces superior a la que había hace aproximadamente 20 años, por lo que se debe resaltar el creciente impacto económico de este cultivo en la actualidad.

#### **1.4. MECANISMOS DE REPRODUCCIÓN Y NECESIDAD DE OBTENCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN VARIETAL**

La fresa es un cultivo altamente heterocigoto y sensible a la endogamia, por lo que requiere de la realización de una selección del *pedigree*, cruzando los mejores genotipos para realizar la selección artificial. Posteriormente, se reproducen las fresas asexualmente, originando nuevas plantas mediante propagación clonal en semilleros, produciendo plantas hijas a partir de los estolones, hecho que asegura el mantenimiento del genotipo a través de las sucesivas generaciones (Brunings et al., 2010).

La base genética de la fresa cultivada es muy estrecha, ya que la mayoría de ellas se originan a partir de 50 clones (Dale y Sjulín, 1990), por lo que resulta difícil de identificar a simple vista el

genotipo de una fresa frente a otra. Tradicionalmente, la identificación de cultivos estaba determinada por la evaluación de diferencias en morfología y fisiología, como pueden ser las hojas, la flor, el fruto o la floración (Nielsen y Lovell, 2000). Sin embargo, estos métodos no son los adecuados para la diferenciación varietal en fresa, porque los cultivos tienen fenotipos muy parecidos, especialmente en el estado vegetativo y los descriptores fenotípicos pueden variar enormemente dependiendo de las condiciones ambientales y de las prácticas de cultivo (Brunings et al., 2010). Además, las relaciones filogenéticas entre las fresas se basan en medidas de interfertilidad y morfología. La caracterización molecular puede informar sobre estas interpretaciones (García et al., 2002).

En los últimos años, la propagación y distribución no regulada de cultivos patentados se ha convertido en un serio problema (Kunihisa, 2010; Honjo et al., 2011) y el componente genético de cada una de las variedades se ha convertido en un factor crítico, ya que cada una de las variedades tiene distintas características en lo que respecta al tiempo de floración, la producción, la calidad del fruto, el tamaño de éste y la resistencia a enfermedades, por lo que errores por la plantación de cultivos inadecuados puede ocasionar pérdidas económicas y de producción importantes (Brunings et al., 2010). Además, los cultivos originados a través de programas de mejora están protegidos mediante licencias de propiedad y se requiere el pago de cánones hacia los propietarios de la patente del cultivo para cada una de las plantas cultivadas (Govan et al., 2008).

Para tratar de mantener la integridad genética y proteger los derechos de los mejoradores, se han desarrollado varios sistemas de marcadores bioquímicos y moleculares, que han sido desarrollados para facilitar el análisis de la diversidad genética y la identificación de cultivos, que incluyen isoenzimas (Bell y Simpson, 1994), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Milella et al., 2006), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), secuencias entre repeticiones simples (ISSR) y repeticiones de secuencia simple (SSR) (Lewers et al., 2005; Gil-Ariza et al., 2006), cada uno de los cuales presenta sus propias limitaciones técnicas.

## **1.5. TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES**

Los marcadores se clasifican en dos categorías principales: marcadores clásicos y marcadores de ADN o moleculares.

Entre los marcadores clásicos consideramos los marcadores morfológicos, los marcadores citológicos y los marcadores bioquímicos. Los marcadores morfológicos permiten distinguir visualmente cualidades como la estructura de las semillas, el color de las flores u otras características agronómicas. Son marcadores fáciles de usar, no requieren instrumentos específicos. En el caso de los marcadores citológicos, revelan variaciones presentes en el número, el patrón de banda, el tamaño, la forma, el orden y la posición del cromosoma. Por otro lado, los marcadores bioquímicos o isoenzimas expresan polimorfismos a nivel de proteína o de ADN (Kumar, 1999), pero la principal limitación de éstos es que se encuentran en cantidades muy reducidas.

Al contrario que los marcadores morfológicos, los marcadores moleculares, basados en polimorfismos del ADN, se distribuyen homogéneamente por todo el genoma y no están influenciados por el ambiente. Se define como marcador genético o molecular, a un gen o secuencia de ADN localizado en una región conocida de un cromosoma, que controla un gen o una característica en particular (Nadeem et al., 2018).

Las características deseables que deben poseer los marcadores moleculares son: ser altamente polimórficos, es decir, multialélicos, reproducibles, de naturaleza codominante, estar distribuidos uniformemente en todo el genoma, discriminantes, no estar sujetos a influencias ambientales, ser neutrales y fácilmente, rápidamente y económicamente detectables (De Vicente y Fulton, 2003).

Los marcadores de ADN o moleculares los podemos clasificar en dos grupos principales, aquellos marcadores basados en métodos de hibridación, como son los marcadores RFLPs (*Restriction*

*Fragment Length Polymorphism*), y los marcadores basados en métodos de PCR, que son los más utilizados actualmente, entre los que destacamos los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DAF (*DNA Amplified Polymorphic*), AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), EST (*Expressed Sequence Tag*) y SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

**Tabla 1.** Comparación de las técnicas principales que involucran marcadores bioquímicos y moleculares para identificar la diversidad genética. Extraída de De Vicente y Fulton, 2003.

Marcador	Codominante	Polimorfismo	Específico de locus	Tecnicidad	Coste
Isoenzimas	Sí	Bajo	Sí	Baja	Bajo
RFLP	Sí	Medio	Sí	Alta	Medio
RAPD	No	Medio	No	Baja	Bajo
DAF	No	Muy alto	No	Baja	Bajo
AP-PCR	No	Muy alto	No	Baja	Bajo
SSR	Sí	Muy alto	Sí	Baja*	Bajo*
SCAR	Sí/No	Bajo/Medio	Sí	Media	Bajo
CAPS	Sí	Bajo/Medio	Sí	Media	Bajo
ISSR	No	Alto	Sí	Baja/Media	Bajo/Medio
AFLP	No	Alto	No	Media	Medio
EST	Sí	Bajo/Medio	Sí	Media	Medio
SNP	Sí	Muy alto	Sí	Alta	Alto

\*: cuando ya se han identificado los microsatélites y se han diseñado los cebadores

No obstante, en este estudio se van a explicar con más profundidad los marcadores utilizados en este trabajo, entre los cuales destacamos los RAPD, ISSR, SSR o microsatélites y los SNPs.

Los marcadores moleculares se pueden utilizar para un amplio rango de actividades, que incluyen la construcción de mapas genéticos de ligamiento, mapas de análisis comparativos, comprender relaciones de germoplasma, detectar genes económicamente importantes, selección asistida por marcadores (MAS) y clonaje basado en los mapas (Kumar, 1999; Antanaviciute, 2016). Además, los marcadores genéticos han conllevado desarrollos importantes en el campo de la mejora genética vegetal y han permitido acelerar y ahorrar costes respecto a los procedimientos previamente empleados en este campo (Nadeem et al., 2018).

### 1.5.1. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

Técnica desarrollada por Williams (1990) y Welsh y McClelland (1990) de manera independiente. La amplificación se realiza mediante una PCR utilizando un único primer corto, de aproximadamente 10 nucleótidos, que amplifica regiones aleatorias del genoma. La amplificación se produce cuando los cebadores hibridan en regiones relativamente próximas y en direcciones opuestas. Para su visualización, el producto de PCR se separa en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se puede detectar el polimorfismo al realizarse la electroforesis confirmando la presencia o ausencia de bandas específicas (Nadeem et al., 2018).

Este tipo de marcadores presentan las siguientes ventajas: se obtienen un número alto de fragmentos, se trata de una técnica sencilla, ya que no requiere la utilización de sondas ni transferencia

a membranas, los cebadores arbitrarios se adquieren fácilmente por lo que no requieren información inicial de tipo genético o genómico y los costes unitarios por ensayo son bajos (De Vicente y Fulton, 2003).

En lo que respecta a las desventajas destacamos las siguientes: se trata de marcadores de herencia dominante, no existe conocimiento previo sobre la identidad de los productos de amplificación, tienen problemas de reproducibilidad (ya que la tecnología RAPD es sensible a los cambios en la calidad del ADN, en los componentes de la PCR y en las condiciones de la PCR) y existen problemas por comigración (De Vicente y Fulton, 2003).

No obstante, fueron el método de elección de Congiu et al. (1999) y Gidoni et al. (1994) en estudios de diferenciación varietal y de Milella et al. (2006) para la evaluación de la variabilidad genética.

### **1.5.2. Secuencia entre repeticiones simples (ISSR)**

Técnica desarrollada por Zietkiewicz et al. (1994). Se basa en la amplificación de segmentos de ADN localizados entre regiones repetidas de microsatélites a una distancia que permita la amplificación. Los cebadores utilizados en esta técnica tienen una longitud de unos 15-30 pares de bases y son regiones repetidas de di-, tri-, tetra- o penta- nucleótidos a los cuales se pueden extender una o varias bases, en la secuencia adyacente a modo de puntos de anclaje (Nadeem et al., 2018). En el desarrollo de la PCR puede haber varias opciones, emplear sólo un cebador, emplear cebadores de características similares o combinar un cebador de secuencia microsatélite anclado y un cebador aleatorio (como los usados para RAPD) (De Vicente y Fulton, 2003).

Este tipo de marcadores presenta las siguientes ventajas: no requieren información previa sobre secuencias, se puede encontrar variación dentro de regiones únicas del genoma en varios loci simultáneamente, tienden a identificar niveles significativos de variación y son específicos de secuencias de microsatélites. Su principal desventaja es que se trata de un marcador dominante (De Vicente y Fulton, 2003).

Este tipo de marcadores han sido utilizados por Arnau et al. (2003) y Kuras et al. (2004) para realizar la identificación varietal y determinar la relación genética entre los cultivos de fresa evaluados y confirmaron que eran una técnica simple, rápida, económica, altamente discriminante y fiable para la identificación varietal en fresa.

### **1.5.3. Microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR)**

Los microsatélites, también llamados repeticiones de secuencia simple (SSR), son repeticiones cortas en serie cuya longitud está entre 1 y 10 pb; los más típicos miden de 2 a 3 pb, son altamente variables y están distribuidos por igual en todo el genoma.

Este tipo de ADN repetitivo representa la repetición por locus más pequeña con un nivel de polimorfismo más alto (Zane et al., 2002), es común en organismos eucariotas, y el número de unidades repetidas varía ampliamente entre los organismos. Los cebadores se construyen a partir de la región del ADN que flanquea el microsatélite, ya que estas regiones tienden a conservarse dentro de las especies.

Estos marcadores son codominantes, requieren muy poco ADN y éste no necesariamente de alta calidad, son sumamente polimórficos, están uniformemente distribuidos en todo el genoma, permiten una interpretación sencilla de los resultados, se pueden automatizar fácilmente y presentan buena resolución analítica y alta reproducibilidad. Por esto, se han convertido en el marcador de elección para estudios de identificación varietal, por ser una técnica de genotipado robusta, rápida y relativamente económica. Trabajos en fresa cultivada (*Fragaria x ananassa*) han identificado un amplio set de microsatélites que permiten la discriminación de genotipos próximos (Brunings et al., 2010), otros grupos han destacado la reproducibilidad y sensibilidad de los microsatélites

para detectar polimorfismos (Lewers et al., 2005; Gil-Ariza et al., 2006; Sargent et al., 2006; Govan et al., 2008). Entre las desventajas destacamos el coste y la complejidad del procedimiento de su descubrimiento (De Vicente y Fulton, 2003).

Además, estudios previos demuestran que los marcadores SSR son altamente transferibles entre especies con distintos niveles de ploidía dentro del mismo género (Brunings et al., 2010), amplificando múltiples y distintos loci en las especies octoploides y son especialmente útiles en fresa cultivada porque presentan tantas variables alélicas para un determinado locus como copias se poseen en el genoma octoploide (Ashley et al., 2003; Brunings et al., 2010), hecho que las hace especialmente útiles en el genotipado (Brunings et al., 2010).

Se han desarrollado más de 400 pares de cebadores SSRs para especies *Fragaria*, la mayoría de ellos provenientes de especies diploides como *F. vesca*, *F. viridis* y *F. bucharica* y especies octoploides como *F. virginiana* y *F. x ananassa*.

Los microsatélites se pueden clasificar en dos grupos principales, los SSRs genómicos y los SSRs derivados de ESTs (Varshney et al., 2005; Zorrilla-Fontanesi et al., 2010).

Los SSRs genómicos provienen de regiones no codificantes del genoma y generalmente no suelen estar ligados a genes con funciones conocidas o caracteres de importancia económica, pero presentan altos niveles de polimorfismo que permiten distinguir entre genotipos similares (Gupta y Varshney, 2000). En cambio, los marcadores derivados de ESTs son marcadores funcionales (Varshney et al., 2005) porque se encuentran presentes en regiones expresadas del genoma y están bien conservados entre distintos taxones, por lo que se suelen utilizar para estudios sinténicos o filogenéticos y pueden estar asociados a genes ligados a caracteres de importancia económica.

Asimismo, los marcadores microsatélites ofrecen la posibilidad de realizar un multiplexado, es decir, utilizar varios cebadores marcados en una misma reacción de PCR. Esto es posible porque el cebador directo de cada uno de los marcadores moleculares lleva unido un fluoróforo que permite diferenciarlo de otro. Este método permite aumentar la rapidez del análisis y reducir la cantidad de reactivos de PCR, reduciendo los costes del proceso.

El número de marcadores posibles a utilizar en la misma reacción viene limitado por el número de fluoróforos distintos disponibles y por el número y el rango de tamaños de los fragmentos a analizar en la electroforesis capilar, la cual, permite una separación del ADN más rápida, sensible y efectiva que la electroforesis en gel de agarosa (Zhang et al., 2011).

#### **1.5.4. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)**

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son sustituciones de una sola base entre secuencias homólogas. Estas variaciones deben darse al menos en un 1% de la población para poder considerarse SNP y que no sea considerado una mutación puntual. La principal ventaja de este tipo de marcadores es la gran abundancia de estos en el genoma, ya que existe una media de un SNP por cada 200 pb, por lo que pueden encontrarse muy cerca del gen de interés o incluso dentro de él (Bonet, 2010).

Existen muchas técnicas y métodos bioinformáticos para el desarrollo y la identificación de SNPs, como el *random shotgun sequencing*, la secuenciación dirigida de amplicones de PCR y la secuenciación de ARN, pero la secuenciación directa de fragmentos de ADN amplificados por PCR de distintos individuos está considerada como la forma más directa para la identificación de estos polimorfismos, a partir del diseño de cebadores para amplificar fragmentos de ADN de 400–700 pb que derivan de genes de interés o de ESTs (Rafalski, 2002).

#### **1.6. TRANSFERIBILIDAD DE MARCADORES MOLECULARES ENTRE CULTIVOS**

Dentro de la familia *Rosaceae* existe una alta tasa de transferibilidad y heterocigosidad de los microsatélites y se ha demostrado que los marcadores moleculares desarrollados en una especie,

son altamente transferibles en otras especies del mismo género. Concretamente, Zorrilla-Fontanesi et al. (2010) demostraron que existe una transferibilidad mayor del 90% de marcadores SSR entre fresa diploide y octoploide, y en el caso de la frambuesa, Fernández-Fernández et al. (2011) y Marulanda et al. (2012) verificaron que también existe una alta transferibilidad entre marcadores en frambuesa roja, frambuesa negra y mora.

Además, la versatilidad de estos marcadores va más allá del género. Existen muchas similitudes entre los distintos cultivos de la familia *Rosaceae*. En el caso concreto de *Fragaria x ananassa* y *Rubus idaeus*, tienen el mismo número de cromosomas, una forma del fruto similar y existen relaciones estrechas entre el ADN cloroplástico y nuclear de ambos (Potter et al., 2007; Bushakra et al., 2011); por tanto, se puede afirmar que existe colinearidad entre ambos genomas y que se pueden transferir marcadores moleculares desarrollados en *Fragaria* a especies de *Rubus*, por las similitudes entre ambos (Bushakra et al., 2011). Además, en el trabajo de Bushakra et al. (2011) se identifican 90 marcadores cuya secuencia se identifica en ambos géneros y se demuestra que es posible alinear los siete grupos de ligamiento de ambos cultivos entre ellos.

También es posible la utilización de marcadores moleculares desarrollados en *Fragaria* en especies de *Prunus* y *Rosa*, porque existe un alta sintenia entre dichos géneros, a pesar de que en el caso de los cultivos del género *Prunus*, como están más alejados filogenéticamente, la transferibilidad y el polimorfismo de los marcadores es menor (Longhi et al., 2014).

## 1.7. MEJORA GENÉTICA VEGETAL

La mejora genética vegetal tiene como objetivo principal el aumento de la productividad, la obtención de variedades resistentes a plagas, la mejora de características agronómicas y la mejora de la calidad. Un estudio de Hayward et al. (1993), estima que durante la segunda mitad del siglo XX, el 50% de los aumentos de cosecha en los cultivos de mayor relevancia, son atribuibles a la introducción de nuevas variedades obtenidas mediante mejora genética.

La mejora genética se puede realizar mediante la selección de mutantes espontáneos provenientes de variedades originales, la realización de cruzamientos a partir de líneas puras para la producción de híbridos o la mutagénesis inducida por métodos físicos o químicos para aumentar la variabilidad de caracteres de interés.

En los últimos años, con el descubrimiento de los marcadores moleculares y la identificación de genes relacionados con caracteres importantes en rosáceas, se han producido muchos cambios en el campo de la mejora genética vegetal con la introducción de la selección asistida por marcadores (MAS). Esta técnica proporciona varias ventajas respecto a la mejora clásica o selección masal, dada la independencia de estos marcadores respecto a las condiciones ambientales y del estadio en el que se encuentra la planta (Francia et al., 2005), permitiendo la selección de la progenie que contiene alelos de genes de interés a estados tempranos de desarrollo. Se considera una técnica útil especialmente cuando se tienen que evaluar un gran número de semillas ya que supone un ahorro de coste, espacio y tiempo (Jannink et al., 2010).

Para la práctica de la mejora asistida por marcadores es necesario que exista una situación de desequilibrio de ligamiento entre el marcador de ADN y un gen específico para realizar un proceso de pre-selección, donde los genotipos que expresen un carácter de interés se seleccionen de manera indirecta basándose en la información proporcionada por el marcador (Xu y Crouch, 2008; Antanaviciute, 2016).

Actualmente, la selección asistida por marcadores resulta especialmente efectiva para caracteres monogénicos, mientras que se tiene que mejorar para caracteres poligénicos controlados por los efectos aditivos de varios genes, hecho que se da en la mayoría de las resistencias a enfermedades en fresa (Heffner et al., 2009).

### **1.7.1. Mejora genética de características agronómicas: firmeza del fruto**

La firmeza del fruto es un carácter complejo asociado con el proceso de maduración, que requiere el desarrollo de múltiples factores y señales del medio ambiente, de la edad, auxinas, enzimas y proteínas que controlan la modificación de la pared de la célula y la madurez del fruto (Civello et al., 1999; Harrison et al., 2001).

Se han identificado un grupo de genes llamados expansinas relacionados con la firmeza que están vinculados a la expansión de la pared celular, la debilidad, el metabolismo y los cambios en los tejidos del fruto. Esto ha permitido el desarrollo de programas de mejora genética vegetal relacionados con la firmeza del fruto, porque es un atributo esencial para la producción, que permite una recolección, manejo y almacenamiento más sencillo. Además, se ha comprobado que las células poco firmes tienen mayor susceptibilidad a infecciones microbianas (Harpster et al., 1998), menor vida post-cosecha y menor calidad; por ello, la mejora de la firmeza del fruto se ha convertido en un objetivo importante en los programas de mejora.

### **1.7.2. Mejora genética de características agronómicas: variedades de día corto, remontantes y de día neutro**

Las variedades de fresa muestran diferentes tipos de respuestas a la longitud del día (fotoperiodo) y a las temperaturas (termoperiodo). Cada tipo de respuesta ha dado lugar a un tipo de cultivares; variedades de día corto, remontantes (o reflorecientes) y de día neutro.

Las variedades de día corto o de cosecha única diferencian yemas florales cuando los días llegan a ser cortos y las temperaturas son bajas, a finales de verano o principio de otoño. Las diferentes fases de floración, fructificación y emisión de estolones tienden a ser separadas. Este tipo de variedades producen estolones vigorosamente hasta que los días se acortan. En condiciones de día corto, incluso con el estolonado ya parado, el desarrollo de coronas y hojas continúa mientras que las condiciones sean favorables (López, 2009).

En cambio, las variedades remontantes diferencian yemas de flor más libremente en días largos (durante todo el verano) que en días cortos. Los estolones se producen desde principios de la primavera hasta que se paran por las bajas temperaturas otoñales; en contraste con las plantas de día corto, las variedades remontantes producen menos estolones y tienden a formar múltiples coronas.

Por último, las variedades de día neutro se ven relativamente poco afectadas por el fotoperiodo y por el termoperiodo y fructificarán siempre que las temperaturas sean suficientemente altas para mantener el crecimiento (Bonet, 2010).

### **1.7.3. Mejora genética de resistencias a plagas o enfermedades**

Los productores y mejoradores de fresa cultivada deben afrontar enfermedades que repercuten en el rendimiento y en la calidad de la fruta, porque algunas de estas pueden causar daños graves y letales en el cultivo. Los principales patógenos que afectan a las plantas de fresa se pueden agrupar en: insectos, bacterias, virus, nematodos y hongos (Garrido et al., 2011).

Se han identificado alrededor de 200 especies distintas de insectos que afectan directa o indirectamente a la fresa. Los más comunes son los áfidos, y la araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), seguido de los thrips (*Frankliella occidentalis*), que causan deformaciones en el fruto.

En cuanto a las bacterias, la patología más común es la mancha angular de la hoja de fresa y es causada por *Xanthomonas fragariae*, que provoca manchas foliares angulares visibles en la superficie inferior de la hoja (Roach et al., 2016).

Respecto a los virus, aunque existen más de 30 virus que infectan a la fresa, las infecciones virales no ocasionan graves pérdidas económicas (Martin y Tzanetakis, 2006).

Tampoco se consideran relevantes las patologías causadas por nematodos, que afectan a la fresa de forma indirecta aumentando su susceptibilidad frente a otras enfermedades.

Por último, el mayor grupo de patógenos en fresa son los hongos, existen más de 50 géneros de hongos distintos que pueden afectar a la fresa cultivada. Entre las patologías causadas por hongos destacamos *Oidium fragariae* que afecta a la hoja, los peciolos, los estolones y el fruto y *Fusarium fragariae* que produce infecciones vasculares que provocan amarillamiento gradual en la hoja hasta ocasionar la marchitez total y coloraciones rojizas en la corona a medida que el patógeno avanza por los tejidos hasta llegar a destruirlos.

Consecuentemente, un objetivo importante para productores y mejoradores es el desarrollo de variedades de fresa resistentes, porque es la técnica más efectiva para el control de enfermedades y plagas.

Sin embargo, potenciar caracteres relacionados con resistencias puede suponer la reducción del sabor y de cualidades nutritivas de gran interés económico en el cultivo. Además, la fresa, se adapta de manera diferente en distintas condiciones ambientales, de manera que una variedad puede crecer satisfactoriamente en un área y presentar resistencia a un patógeno, pero no hacerlo en otra con condiciones climáticas distintas por la presencia de otras cepas o patotipos que afecten al cultivo (Garrido et al., 2011).

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

El objetivo global del trabajo final de grado es reforzar el desarrollo de estudios genéticos en la empresa Valgenetics S.L. Para realizar esta tarea se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Implantar un conjunto de marcadores microsatélites multiplexado que permita la diferenciación de las variedades de fresa cultivada presentes en la colección de la empresa.
2. Evaluar la transferibilidad de estos marcadores a la especie frambuesa y utilizar un set multiplexado para la diferenciación varietal de ésta.
3. Comparar en ambas especies los resultados de diferenciación genética y de relaciones de parentesco obtenidas en los microsatélites con los logrados utilizando los marcadores RAPD e ISSR.
4. Estudiar la posible asociación de marcadores SSR a caracteres de interés agronómico como la firmeza del fruto y el carácter día corto, en variedades de la colección de Valgenetics S.L.
5. Realizar una revisión bibliográfica que sirviera como base para plantear posibles proyectos que podrían ser de interés futuro en el área de genética vegetal de Valgenetics S. L.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se recogieron muestras de hoja de las 37 variedades de *Fragaria x ananassa* provenientes de distintos orígenes y que estaban presentes en el invernadero de Valgenetics S.L., ubicado en la Universidad de Valencia (Tabla 2).

**Tabla 2.** Origen de las variedades analizadas.  
La abreviatura S.I. significa sin información del origen.

Variedad	Origen	Variedad	Origen	Variedad	Origen
F01	Obtentor 1 (S.I.)	F14	Obtentor 1: programa 2	F27	Obtentor 2: Programa 5
F02		F15		F28	
F03	Obtentor 1: programa 1	F16		F29	Obtentor 1: Programa 3
F04	Obtentor 1 (S.I.)	F17	Obtentor 1 (S.I.)	F30	Obtentor 3 (S.I.)
F05		F18	Obtentor 1: programa 3	F31	Obtentor 2 (S.I.)
F06		F19		F33	Obtentor 2: programa 6
F07	Obtentor 1: programa 1	F20	Obtentor 1: programa 4	F34	
F08		F21		F35	
F09	Obtentor 1 (S.I.)	F22		F36	
F10		F23		F37	Obtentor 2: programa 5
F11		F24	F38		
F12		F25	Obtentor 2: Programa 5		
F13		F26			

Allí las plantas crecieron en condiciones controladas a una temperatura de 26°C durante el día y a 22/23°C durante la noche con una fuente lumínica que les proporcionaba dos horas más de luz. El ADN de las muestras recogidas se extrajo de inmediato y se guardaron muestras de hoja a -80°C para usos posteriores.

#### 3.2. EXTRACCIONES Y CUANTIFICACIONES DEL ADN

Se realizaron las extracciones de ADN a partir de 100 mg de hoja fresca utilizando el kit comercial *NucleoSpin Plant-II Kit (Macherey-Nagel)*. Se estimó la pureza y la concentración del ADN con el *NanoDrop2000c spectrophotometer (Thermo Scientific)* y se evaluó la calidad de ADN por las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm que aporta el propio equipo. Una vez cuantificadas las muestras, se preparó una dilución con agua estéril de cada una de ellas a una concentración de 10 ng/μL para evitar la sobresaturación de la reacción de PCR y se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

#### 3.3. CONTROL: AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA ACTINA Y SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Se realizó una amplificación parcial del gen de la actina de cada una de las muestras para evaluar la calidad del ADN. Se utilizó el equipo *2720Thermalcycler (Applied Biosystems)*, los reactivos mostrados en la tabla 3 y las condiciones de amplificación detalladas en la figura 4.

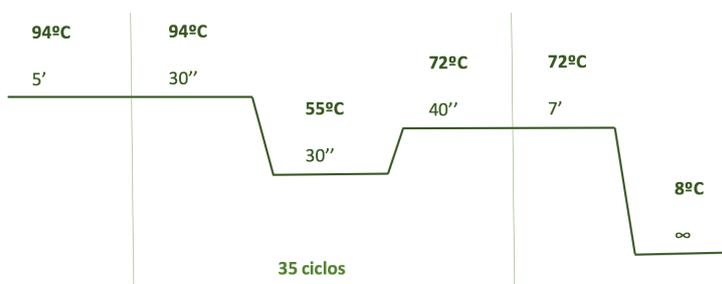
Los cebadores utilizados fueron previamente diseñados por el equipo de Valgenetics S.L., se diseñaron a partir de regiones conservadas del gen de la actina, una proteína globular presente en

todos los organismos eucariotas. Uno de ellos era un cebador estándar y el otro era un cebador degenerado, para asegurar la hibridación en un amplio número de especies.

El objetivo de esta amplificación era realizar un control de extracción del material genético, y así comprobar que las muestras se habían extraído correctamente y que no había inhibición de la amplificación por parte de los compuestos antioxidantes, abundantes en la fresa cultivada.

**Tabla 3.** Composición de la PCR utilizando los cebadores para la amplificación del gen de la actina.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tampón 10x	2,5 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µL	3 mM
dNTPs (10mM cada uno)	0,5 µL	0,2 mM
Cebador directo (10 µM)	1 µL	0,4 µM
Cebador reverso (10 µM)	1 µL	0,4 µM
Taq Polimerasa (1 U/µL)	1 µL	0,04 U/µL
ADN (10 ng/µL)	1 µL	0,4 ng/µL
H <sub>2</sub> O	16,5 µL	



**Figura 4.** Esquema de las condiciones de PCR empleadas en la amplificación del gen de la actina.

Los productos obtenidos fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con GelRed durante 30 minutos a 90 V.

### 3.4. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES RAPD E ISSR

Se amplificó el ADN genómico en 25 µL totales utilizando los cebadores de los marcadores RAPD o los marcadores ISSR mostrados en la tabla 4.

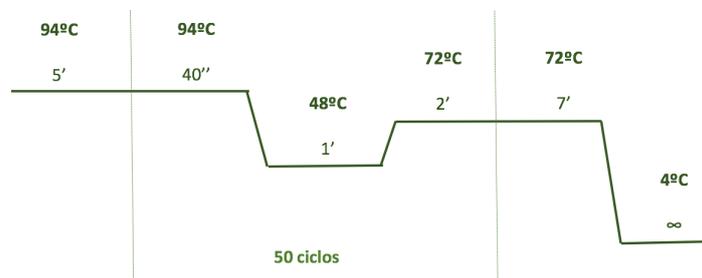
**Tabla 4.** Secuencia de los cebadores de los marcadores RAPD e ISSR.

Marcador	Secuencia
ISSR1	CACCACCACGC
ISSR2	GAGGAGGAGGC
ISSR3	CTCTCTCTCTCTTG
ISSR4	CACACACACAGT
RAPD1	CAGGCCCTTC
RAPD2	GTGATCGCAG
RAPD3	CAGCACCCAC

**Tabla 5.** Composición de la PCR utilizando los marcadores RAPD e ISSR.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tampón 10X	2,5 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µL	3 mM
dNTPs (10 mM cada uno)	0,5 µL	0,2 mM
Marcador molecular (10 µM)	2 µL	0,4 µM
Taq Polimerasa (1 U/µL)	1 µL	0,04 U/µL
ADN (10 ng/µL)	1 µL	0,4 ng/µL
H <sub>2</sub> O	16,5 µL	

En ambos casos la amplificación se llevó a cabo con las condiciones detalladas en la Figura 5 y los productos obtenidos se separaron realizando una electroforesis en gel de agarosa al 2,5% teñido con GelRed durante 135 minutos a 90 V.



**Figura 5.** Esquema de las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los marcadores RAPD e ISSR.

### 3.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES

#### 3.5.1. Marcadores microsatélites utilizados para la diferenciación varietal

##### 3.5.1.1. Selección de los marcadores microsatélites

A partir de una búsqueda bibliográfica, se seleccionaron 9 marcadores microsatélites para la especie *Fragaria x ananassa* o para otras especies del género *Fragaria*, en las que se hubiese comprobado su reproducibilidad en fresa cultivada, como es el caso de M3, M7 y M8.

Los principales criterios por los cuales se seleccionaron los marcadores fueron que tuviesen altos porcentajes de polimorfismo, que tuviesen un número de alelos considerable y que se considerasen reproducibles por parte de la bibliografía utilizada (tabla 6).

**Tabla 6.** Especie a partir de la cual se obtuvieron los marcadores, referencia bibliográfica, número de alelos y porcentaje de polimorfismo de los microsatélites.

Marcador	Especie de referencia	Referencia bibliográfica	Número de alelos	Porcentaje de polimorfismo
M1	<i>F. x ananassa</i>	Honjo et al., 2011	25	98,7%
M2	<i>F. x ananassa</i>	Sargent et al., 2008	10-20	72,7-76,2%
M3	<i>F. vesca</i>	Sargent et al., 2006	34-37	81,8-98,3%
M4	<i>F. x ananassa</i>	Lewers et al., 2005	8-29	70,4-98,3%
M5	<i>F. x ananassa</i>	Lewers et al., 2005	20	86,3%
M6	<i>F. x ananassa</i>	Sargent et al., 2008	20	68,2%
M7	<i>F. chiloensis</i>	Chambers et al., 2013	9	77,2%
M8	<i>F. bucharica</i>	Sargent et al., 2006	7	75,5%
M9	<i>F. x ananassa</i>	Sargent et al., 2008	8-16	49,1-86,3%

Con el fin de obtener la secuencia de los cebadores e información adicional sobre el marcador, se buscaron los microsatélites en las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y GDR (*Genome Database for Rosaceae*).

### 3.5.1.2. Amplificación de los marcadores SSR y separación de los productos obtenidos

En primer lugar, teniendo en cuenta los supuestos tamaños de las bandas amplificadas por cada marcador, se eligió un fluoróforo con el que marcar el cebador directo de cada par. Esto permitiría realizar el mutiplexado posterior del mayor número de marcadores (tabla 7).

Posteriormente, se amplificaron los marcadores microsatélites por separado en aquellas muestras en las que había una mayor concentración de ADN y un mayor ratio 260/280 para poder comprobar su reproducibilidad, verificar que el producto de amplificación obtenido se encontraba dentro del rango de tamaño esperado y evitar problemas posteriormente en la realización del mutiplexado.

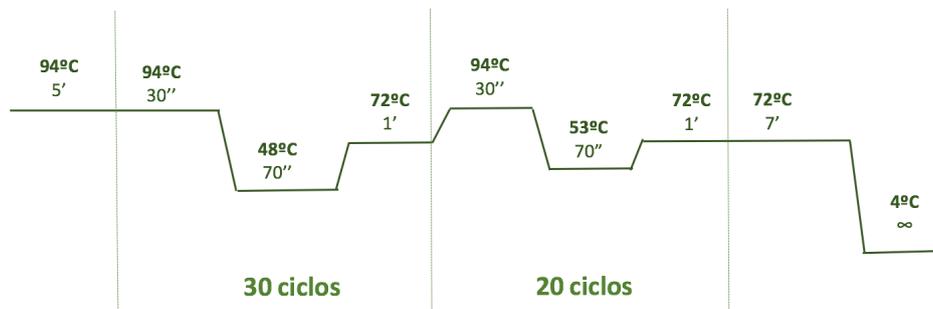
Se unificaron las condiciones de PCR, para permitir la amplificación de todos los microsatélites en la misma tanda de amplificación y se llevó a cabo la amplificación en 25  $\mu$ L totales de reacción, utilizando los marcadores de la tabla 7, los reactivos que aparecen en la tabla 8 y las condiciones de amplificación detalladas en la figura 6.

**Tabla 7.** Tamaño de banda esperado y fluoróforo de los marcadores microsatélites.

Marcador	Tamaño de banda esperado	Fluoróforo
M1	244-302	NED (amarillo)
M2	136-202	NED (amarillo)
M3	72-130	NED (amarillo)
M4	240-320	VIC (verde)
M5	200-236	VIC (verde)
M6	105-147	VIC (verde)
M7	298-375	6-FAM (azul)
M8	115-172	6-FAM (azul)
M9	105-147	6-FAM (azul)

**Tabla 8.** Composición de la PCR utilizando los marcadores microsatélites.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tampón 10X	2,5 $\mu$ L	1x
dNTPs (2,5 mM)	2 $\mu$ L	0,2 mM
Cebador directo (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L	0,08 $\mu$ M
Cebador reverso (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L	0,08 $\mu$ M
Taq Polimerasa (1 U/ $\mu$ L)	0,6 $\mu$ L	0,024 U/ $\mu$ L
ADN (10 ng/ $\mu$ L)	1,25 $\mu$ L	0,4 ng/ $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	18,25 $\mu$ L	



**Figura 6.** Esquema de las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los marcadores microsatélites para la diferenciación varietal.

Después de realizar la amplificación, se separaron los productos obtenidos en un gel de agarosa al 2,5% a 90 V durante 110 minutos para comprobar previamente que la reacción había sido correcta y se apreciaba producto de amplificación.

Posteriormente, se enviaron las muestras al servicio de genómica de la Universidad de Valencia, donde se realizó la electroforesis capilar, que permite detectar pequeñas diferencias de pares de bases entre alelos. Se utilizó el analizador de fragmentos *ABI 3730XL* (*Applied Biosystems*) y se prepararon las muestras añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de formamida al 10%, 5  $\mu\text{L}$  de muestra y 0,2  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular GS500LIZ.

Finalmente, los picos obtenidos en el electroferograma se analizaron en el programa *Peak scanner2.0* (*Thermo Fisher Scientific*), utilizando como estándar de tamaño GS500LIZ\_3730 y como método de análisis *sizing default-PP*.

### 3.5.1.3. Amplificación multiplexada de los microsatélites

Para realizar el multiplexado de los SSRs, se tuvo en cuenta el tamaño de los fragmentos amplificados y el fluoróforo asociado al marcador. Se mantuvieron las condiciones de la reacción y las concentraciones de los cebadores a excepción de la de los marcadores M4, M5 y M6 que se aumentó a 0,1  $\mu\text{M}$ .

Se seleccionaron los marcadores M1, M5, M8 y M9 para realizar la amplificación multiplexada de los microsatélites en fresa y en el caso de la frambuesa, se utilizaron los marcadores M1, M3, M4, M5, M6 y M8.

Con el fin de aumentar la sensibilidad en la visualización de los productos en la electroforesis capilar, el volumen de muestra empleado se aumentó a 7,5  $\mu\text{L}$ .

### 3.5.2. Marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos

Se seleccionaron los marcadores M10 y M11 (Ashley et al., 2003; Cipriani et al., 2004), que según el estudio de Urrutia et al. (2015) se encontraban relacionados con la firmeza del fruto y la variedad del día corto respectivamente. Se comprobó que ambos marcadores tenían temperaturas de hibridación similares y se podían amplificar en una misma reacción. Como el tamaño del fragmento esperado era solapante se escogieron dos fluoróforos distintos para su marcaje (tabla 9).

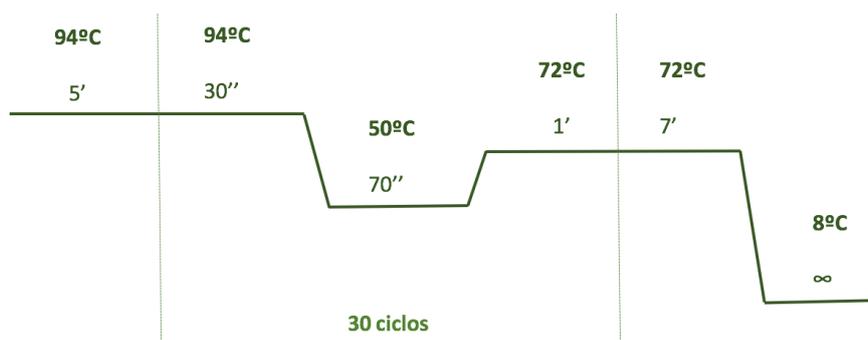
**Tabla 9.** Característica agronómica asociada al marcador, tamaño de alelo esperado, fluoróforo y temperatura de hibridación del cebador.

Marcador	Característica agronómica	Tamaño de alelo esperado (pb)	Fluoróforo	Tª hibridación (°C)
M10	Firmeza del fruto	114-292	6-FAM (azul)	49,7
M11	Variedad de día corto	168-204	NED (amarillo)	51,6

Se seleccionaron las variedades F33, F34, F35, F36 y F38 que provenían del mismo obtentor pero presentaban fenotipos diferentes para los caracteres agronómicos analizados (tabla 10). Se realizó la amplificación manteniendo las concentraciones de las reacciones anteriores (tabla 8), pero siguiendo las condiciones detalladas en la figura 7.

**Tabla 10.** Fenotipos de las variedades analizadas.

Variedad	Carácter
F33	Baja firmeza y variedad de día corto
F34	Variedad de día neutro
F35	Alta firmeza y variedad de día corto
F36	Variedad de día corto
F38	Variedad de día neutro



**Figura 7.** Esquema de las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos.

La separación de los productos obtenidos fue la misma con la que se separaron las muestras analizadas con los marcadores SSR para la realización de la diferenciación varietal.

### 3.6. AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO (*CLUSTERING*)

Se identificaron todos los alelos detectados en las variedades vegetales analizadas y se convirtió el patrón de bandas obtenido en la electroforesis en gel de agarosa o en la electroforesis capilar en un sistema binario.

Cada alelo presente en cada uno de los genotipos analizados se evaluó como ausente (0) o presente (1) y se realizó un análisis del *pedigree*. Se presentaron todos los resultados obtenidos en una matriz usando el índice *Jaccard*, que mide la similitud entre el conjunto de datos analizados y proporciona un valor entre 0 y 1.

Como método de agrupamiento se utilizó el método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) y se obtuvo un dendrograma que representaba las relaciones de similitud de las distintas variedades. El análisis se realizó a través de la página web creada con esta finalidad <http://genomes.urv.cat/UPGMA>.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DIFERENCIACIÓN VARIETAL EN FRESA

#### 4.1.1. Marcadores RAPD

En la siguiente tabla se muestran los parámetros analizados tras la amplificación por PCR de 37 variedades de *Fragaria x ananassa* con los marcadores moleculares de tipo RAPD.

Tabla 11. Resultados obtenidos con los marcadores de tipo RAPD en fresa.

Marcador	Nº total de fragmentos amplificados	Bandas polimórficas (PB)	% PB	Nº genotipos distinguidos	% genotipos distinguidos	Reproducibilidad
RAPD1	14	14	100	37	100	Baja
RAPD2	2	0	0	0	0	Baja
RAPD3	10	10	100	15	40	Baja

Se puede observar cómo se obtienen resultados muy distintos dependiendo del marcador utilizado, sin embargo, en todos ellos se han podido detectar los problemas presentes en este tipo de marcadores, que hacen de ellos el marcador molecular menos reproducible y de menor fiabilidad de los evaluados.

Son marcadores poco discriminativos y la interpretación de las bandas ha resultado complicada porque existen problemas de comigración y en algunos casos ha sido complicado determinar si existía una banda o dos, dificultando una correcta interpretación de los alelos presentes.

Es una técnica poco reproducible porque utilizando los mismos equipos y las mismas condiciones en el análisis de una muestra por duplicado, se han detectado diferencias en la migración de las bandas y en el número de bandas obtenidas, dificultando la estandarización de los marcadores y una interpretación adecuada de los resultados.

Además, son marcadores dominantes e inespecíficos, porque una banda detectada en dos muestras distintas como la misma banda, puede comprender distintos productos de amplificación, ya que el tipo de electroforesis realizado permite separar el ADN según el tamaño, pero no según la secuencia de las bases.

En el marcador RAPD1, todos los alelos identificados han resultado polimórficos, es decir, ninguno de ellos se encontraba presente en todas las variedades analizadas y se han podido distinguir todas las variedades (tabla 11). No obstante, los resultados obtenidos no se pueden considerar fiables, por la falta de reproducibilidad del marcador.

En el segundo marcador, RAPD2, sólo se han amplificado dos fragmentos en cada una de las variedades, que correspondían a regiones conservadas dentro de las muestras analizadas y se encontraban presentes en todas ellas. Consecuentemente, no se ha conseguido diferenciar ninguna de las variedades, considerando, según el patrón de bandas obtenido, las 37 variedades distintas analizadas como la misma variedad (tabla 11)

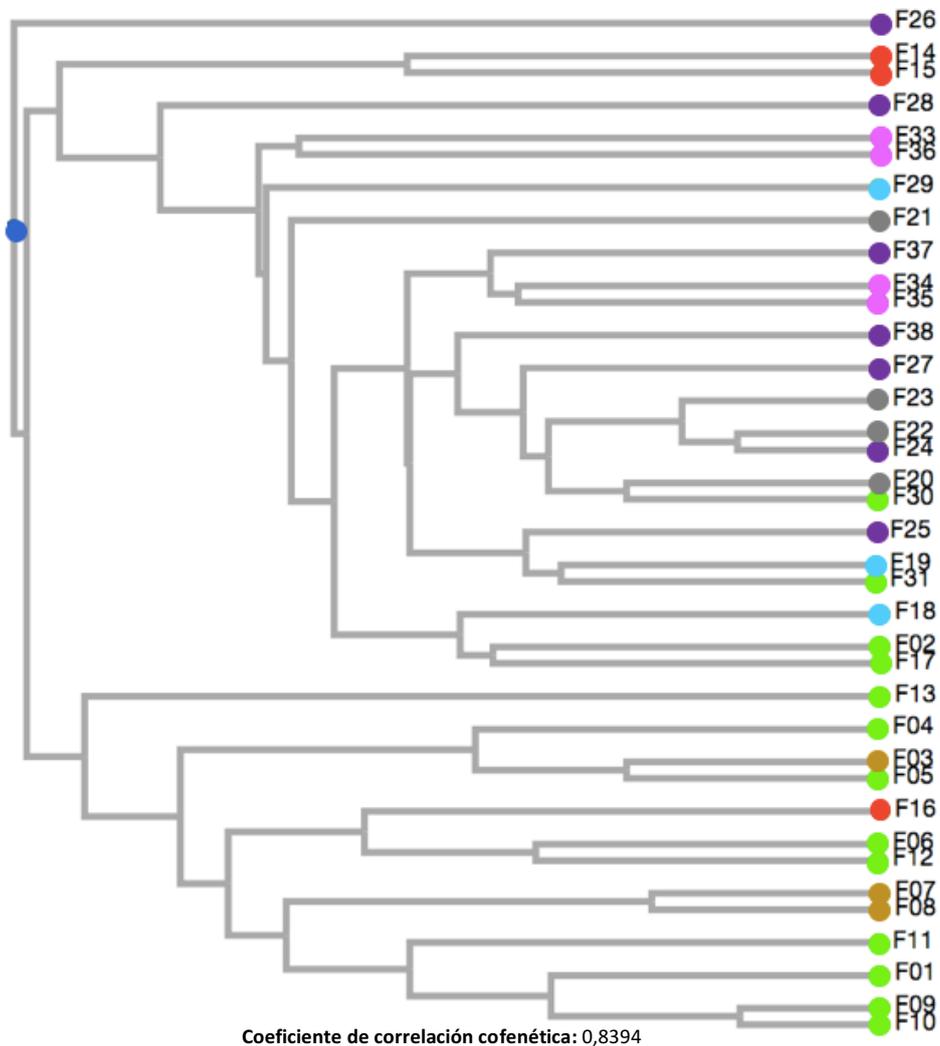
En el marcador RAPD3, se han amplificado diez fragmentos en todas las variedades analizadas y todos ellos se han considerado polimórficos, no obstante, no se puede afirmar que se trate de un marcador con un polimorfismo elevado porque se han podido diferenciar el 40% de las variedades (tabla 11).

Respecto a las relaciones de parentesco obtenidas con este tipo de marcadores, se destaca que según estos, entre las variedades F22, F23 y F24 existen muchas similitudes. El coeficiente de similitud (C.S.) obtenido combinando los 3 marcadores RAPD es de 0,8 entre las variedades F22 y F23 y tiene un valor de 0,89 entre las variedades F22 y F24 y entre F23 y F24 (tabla 12). Las variedades F22 y F23 sí que pertenecen al mismo programa de mejora por lo que podrían estar emparentadas, pero la variedad F24 corresponde a un obtentor distinto (figura 8). Este resultado

podría deberse a que, debido a las limitaciones de la técnica, se hayan analizado falsos positivos que hayan causado la alta similitud en la interpretación de los patrones de bandas de las muestras F22 y F24 y F23 y F24. Algo similar sucede con las variedades F09 y F10, que muestran una alta similitud entre ellas con un valor de este coeficiente de 0,89, a pesar de que no se tiene información sobre su origen (tabla 12).

Por otro lado, en el caso de las variedades F07 y F08, los resultados obtenidos coinciden con lo esperado, ya que poseen un valor del coeficiente de similitud mayor a 0,8 y fueron originadas en el mismo proyecto de mejora (figura 8).

En cuanto a la organización de las ramas en el dendrograma obtenido, no se pueden diferenciar los dos obtentores de los que proceden las muestras de fresa analizada, ya que F02, F21, F22, F24, F28, F30 y F31 se encuentran en el mismo grupo que las variedades del obtentor 1 (figura 8). Esto mismo ocurre en el estudio de Degani et al. (1998), en el que no se encontró correlación entre la similitud genética obtenida con los marcadores RAPD y la información conocida del *pedigree* en algunos de los cultivos de fresa estudiados.



**Figura 8.** Dendrograma obtenido combinando los resultados de los marcadores RAPD en fresa.

El color amarillo corresponde a las muestras pertenecientes al programa 1 del obtentor 1, el rojo al programa 2 del obtentor 1, el azul al programa 3 del obtentor 1, el gris al programa 4 del obtentor 1, el morado al programa 5 del obtentor 2, el rosa al programa 6 del obtentor 2 y el verde a las muestras de las cuales no se dispone de información sobre su origen (tabla 2).

Este tipo de marcadores, también fueron utilizados en estudios similares como en el caso de Congi et al. (1999) para la identificación de la variedad de fresa “*Marmolada*” y por Gidoni et al.

(1994) para la diferenciación de dos variedades muy próximas filogenéticamente como la variedad “*Ofra*” (originada a partir del cruce de “*Dorit*” y “*Parker*”) y la variedad “*Dorit*” (fruto del cruce entre “*Nurit*” y “*Dover*”). Fueron también la técnica de elección de García et al. (2002) para la diferenciación de 8 genotipos de fresa, y en ese trabajo, de los 20 marcadores utilizados, 16 consiguieron aportar resultados polimórficos y 3 consiguieron diferenciar todos los genotipos evaluados como el marcador RAPD1. En cambio, 4 de ellos no produjeron ningún producto de amplificación, y 2 marcadores no amplificaron bandas polimórficas, igual que en el caso del presente estudio del marcador RAPD2. También apoyan estos resultados, los obtenidos por Degani et al. (1998), en el que 7 marcadores de los 33 utilizados no permitieron amplificar bandas polimórficas.

Además, al que igual que en este estudio, numerosos trabajos en los que utilizaron este tipo de marcadores detectaron los problemas de reproducibilidad, interpretación, poca discriminación y estandarización detallados en el presente trabajo, que dependía enormemente de las condiciones de las reacciones realizadas (MacPherson et al., 1993; Perez et al., 1998; Rabouam et al., 1999; Pascual et al., 2006; Govan et al., 2008).

Se puede concluir que, a pesar de que se han conseguido diferenciar las muestras analizadas, los resultados obtenidos no se pueden considerar como fiables por los problemas detallados anteriormente, así que estos se deberían contrastar con otro tipo de marcadores. Asimismo, no se ha podido considerar como una herramienta útil para determinar relaciones de parentesco entre variedades porque no ha conseguido esclarecer las relaciones de parentesco que había entre las distintas variedades, ha considerado como muy próximas muestras que no tenían ninguna relación entre ellas como F03 y F05 (C.S: 0,8), F09 y F10 (C.S: 0,89) y F22 y F24 (C.S: 0,89) y las ramas obtenidas en el dendrograma no han permitido agrupar las variedades por obtentores (figura 8 y tabla 12).

Tabla 12. Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores RAPD en fresa.

	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F33	F34	F35	F36	F37	F38	
F01	1,00	0,36	0,53	0,39	0,67	0,58	0,46	0,55	0,78	0,70	0,55	0,60	0,33	0,18	0,33	0,43	0,46	0,42	0,36	0,50	0,39	0,42	0,31	0,33	0,46	0,29	0,23	0,31	0,22	0,33	0,29	0,25	0,33	0,33	0,23	0,29	0,36	
F02		1,00	0,53	0,50	0,44	0,29	0,29	0,25	0,27	0,33	0,33	0,27	0,58	0,33	0,36	0,35	0,69	0,67	0,38	0,50	0,50	0,54	0,54	0,54	0,47	0,31	0,46	0,33	0,56	0,46	0,40	0,44	0,44	0,53	0,36	0,50	0,47	
F03			1,00	0,67	0,80	0,44	0,44	0,50	0,44	0,50	0,41	0,35	0,44	0,18	0,35	0,42	0,44	0,41	0,44	0,47	0,47	0,41	0,33	0,35	0,44	0,32	0,35	0,26	0,38	0,35	0,39	0,35	0,35	0,50	0,35	0,39	0,37	
F04				1,00	0,69	0,31	0,40	0,46	0,29	0,36	0,36	0,29	0,39	0,15	0,29	0,29	0,40	0,58	0,40	0,43	0,54	0,58	0,46	0,50	0,40	0,33	0,50	0,27	0,33	0,39	0,54	0,38	0,47	0,57	0,85	0,54	0,50	
F05					1,00	0,53	0,53	0,62	0,54	0,62	0,50	0,43	0,43	0,13	0,33	0,41	0,53	0,50	0,44	0,57	0,57	0,50	0,40	0,43	0,53	0,22	0,43	0,24	0,30	0,43	0,47	0,33	0,41	0,41	0,33	0,38	0,44	
F06						1,00	0,47	0,42	0,58	0,54	0,43	0,73	0,27	0,14	0,36	0,64	0,38	0,33	0,22	0,31	0,31	0,35	0,18	0,19	0,29	0,31	0,19	0,25	0,19	0,19	0,17	0,21	0,21	0,21	0,19	0,17	0,29	
F07							1,00	0,82	0,46	0,54	0,54	0,46	0,27	0,23	0,36	0,44	0,38	0,43	0,38	0,50	0,31	0,43	0,33	0,36	0,38	0,31	0,27	0,25	0,25	0,36	0,40	0,28	0,35	0,35	0,19	0,31	0,47	
F08								1,00	0,55	0,64	0,50	0,42	0,31	0,17	0,31	0,40	0,33	0,39	0,33	0,46	0,27	0,39	0,29	0,31	0,33	0,27	0,21	0,20	0,21	0,31	0,36	0,24	0,31	0,31	0,21	0,27	0,33	
F09									1,00	0,89	0,70	0,60	0,46	0,18	0,33	0,43	0,36	0,31	0,27	0,39	0,29	0,31	0,21	0,23	0,36	0,29	0,14	0,31	0,16	0,23	0,20	0,25	0,25	0,25	0,14	0,20	0,27	
F10										1,00	0,64	0,55	0,55	0,17	0,31	0,40	0,43	0,39	0,33	0,46	0,36	0,39	0,29	0,31	0,43	0,27	0,21	0,29	0,21	0,31	0,27	0,31	0,31	0,31	0,21	0,27	0,33	
F11											1,00	0,55	0,42	0,27	0,31	0,40	0,43	0,39	0,25	0,36	0,37	0,39	0,29	0,31	0,43	0,36	0,21	0,39	0,21	0,31	0,36	0,31	0,31	0,13	0,31	0,27	0,33	
F12												1,00	0,33	0,18	0,23	0,54	0,36	0,31	0,19	0,29	0,29	0,31	0,21	0,23	0,36	0,39	0,14	0,21	0,16	0,23	0,20	0,25	0,25	0,25	0,23	0,20	0,36	
F13													1,00	0,30	0,33	0,25	0,46	0,42	0,27	0,39	0,39	0,42	0,42	0,46	0,36	0,20	0,33	0,21	0,38	0,33	0,29	0,33	0,33	0,33	0,33	0,29	0,36	
F14														1,00	0,63	0,21	0,33	0,27	0,33	0,36	0,25	0,40	0,40	0,44	0,33	0,25	0,44	0,40	0,26	0,44	0,36	0,31	0,31	0,31	0,30	0,36	0,33	
F15															1,00	0,33	0,36	0,31	0,37	0,50	0,29	0,42	0,42	0,46	0,27	0,29	0,46	0,31	0,38	0,33	0,39	0,25	0,33	0,33	0,23	0,29	0,36	
F16																1,00	0,44	0,24	0,21	0,38	0,16	0,24	0,24	0,25	0,28	0,29	0,18	0,24	0,24	0,25	0,22	0,33	0,20	0,26	0,25	0,22	0,28	
F17																	1,00	0,67	0,47	0,75	0,50	0,67	0,67	0,73	0,69	0,24	0,58	0,43	0,56	0,73	0,50	0,53	0,53	0,53	0,46	0,50	0,57	
F18																		1,00	0,54	0,58	0,58	0,80	0,65	0,70	0,54	0,36	0,55	0,50	0,53	0,55	0,58	0,40	0,62	0,62	0,42	0,58	0,67	
F19																			1,00	0,62	0,50	0,67	0,67	0,58	0,69	0,40	0,58	0,54	0,47	0,58	0,75	0,53	0,64	0,64	0,58	0,62	0,57	
F20																				1,00	0,43	0,73	0,73	0,80	0,62	0,25	0,64	0,36	0,50	0,80	0,54	0,57	0,57	0,50	0,54	0,62		
F21																					1,00	0,58	0,46	0,50	0,62	0,25	0,64	0,36	0,41	0,50	0,54	0,38	0,57	0,57	0,39	0,54	0,50	
F22																						1,00	0,80	0,89	0,67	0,36	0,70	0,50	0,53	0,70	0,73	0,50	0,75	0,75	0,55	0,74	0,82	
F23																							1,00	0,89	0,67	0,36	0,70	0,39	0,53	0,70	0,73	0,62	0,75	0,62	0,55	0,58	0,67	
F24																								1,00	0,58	0,29	0,78	0,42	0,71	0,78	0,64	0,54	0,67	0,67	0,60	0,64	0,73	
F25																									1,00	0,31	0,54	0,43	0,39	0,73	0,75	0,64	0,64	0,53	0,46	0,62	0,57	
F26																										1,00	0,20	0,36	0,33	0,20	0,33	0,38	0,47	0,67	0,29	0,43	0,31	
F27																												1,00	0,42	0,47	0,78	0,64	0,54	0,54	0,54	0,60	0,64	0,58
F28																													1,00	0,44	0,46	0,40	0,40	0,50	0,42	0,46	0,43	
F29																														1,00	0,47	0,41	0,37	0,63	0,63	0,47	0,50	0,56
F30																															1,00	0,64	0,67	0,54	0,54	0,60	0,64	0,58
F31																																1,00	0,57	0,69	0,27	0,50	0,67	0,62
F33																																	1,00	0,50	0,50	0,54	0,57	0,44
F34																																		1,00	0,71	0,43	0,69	0,64
F35																																			1,00	0,54	0,69	0,64
F36																																				1,00	0,50	0,46
F37																																					1,00	0,62
F38																																						1,00

#### 4.1.2. Marcadores ISSR

En la siguiente tabla se muestran los parámetros analizados tras la amplificación por PCR de 37 variedades de *Fragaria x ananassa* con los marcadores moleculares de tipo ISSR.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos con los marcadores de tipo ISSR en fresa.

Marcador	Nº total de fragmentos amplificados	Bandas polimórficas (PB)	% PB	Nº genotipos distinguidos	% genotipos distinguidos	Reproducibilidad
ISSR1	16	16	100	28	75	Media
ISSR2	14	14	100	15	40	Media
ISSR3	12	11	92	9	24	Media
ISSR4	6	3	50	1	0	Media

Se trata de una técnica simple, rápida, económica y no es necesario poseer información previa para el desarrollo de los marcadores. Los ISSR son dominantes, poseen una reproducibilidad media y la fiabilidad de los resultados obtenidos es mucho mayor que en el caso de los marcadores RAPD.

En este estudio, con el marcador ISSR1 se han amplificado 16 fragmentos y todos ellos se han considerado polimórficos. Además, ha permitido distinguir el 75% de los genotipos, así que se trata de un marcador discriminante e informativo (tabla 13).

Lo mismo ocurre con el marcador ISSR2, en el que todos los alelos detectados han resultado polimórficos, pero en este caso se trata de un marcador menos discriminante, ya que ha permitido diferenciar el 40% de las variedades analizadas (tabla 13).

En el caso del marcador ISSR3, se han amplificado 12 fragmentos, 11 de los cuales no han estado presentes en todas las variedades y ha posibilitado la distinción de alrededor de una cuarta parte de los genotipos (tabla 13).

Por último, ISSR4 ha permitido identificar 6 alelos, la mitad de los cuales se han considerado polimórficos y ha conseguido diferenciar sólo un genotipo (tabla 13).

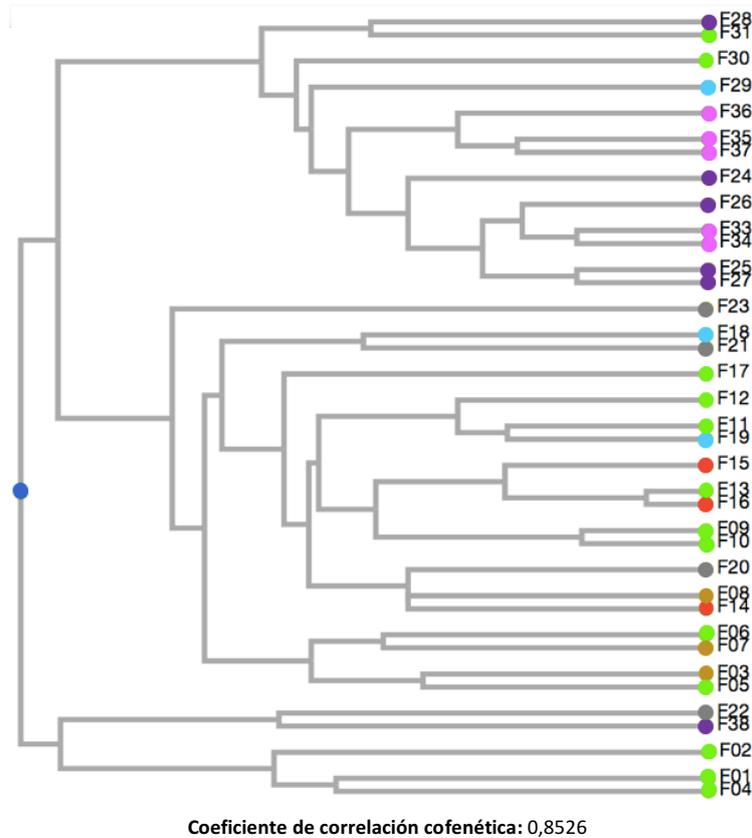
Sin embargo, combinando los 4 marcadores ISSR empleados, se han logrado distinguir todas las variedades analizadas, superando las limitaciones que poseen cada uno de ellos individualmente, por lo que se pueden considerar una buena técnica para la diferenciación de variedades de fresa cultivada. Además, se han reducido las posibles ambigüedades a la hora de interpretar los resultados, frecuentes en los marcadores moleculares de tipo RAPD.

En lo que respecta a la organización de los grupos en el dendrograma, con este tipo de marcadores sí que se han podido diferenciar principalmente dos grandes grupos, la primera rama correspondiente a las variedades del obtentor 2 y la segunda rama que agrupa las variedades del obtentor 1, a pesar de que la variedad F29 correspondiente a este último, haya sido agrupada con las variedades del segundo obtentor (figura 9).

Según la matriz de similitud obtenida, la variedad F26 presenta un alto coeficiente de similitud con las variedades F25 (C.S: 0,85), F27 (C.S: 0,76), F33 (C.S: 0,85) y F34 (C.S: 0,85), y a su vez, entre F33 y F34 y entre F25 y F34, se ha obtenido un coeficiente de similitud de 0,90. Las variedades F25, F26 y F27 pertenecen al mismo programa de mejora y las muestras F33 y F34 podrían compartir origen por haberse obtenido a partir del mismo procedimiento de mejora, pero no se puede afirmar que F25, F26, F27, F33 y F34 estén emparentadas porque no corresponden al mismo programa. Sin embargo, no se descarta que se pudieran haber realizado cruces entre ellas porque las cuatro provienen del mismo obtentor (figura 9, tabla 14).

También se resalta el alto valor del coeficiente de similitud calculado entre las variedades F09 y F10 que alcanza un valor de 0,90, valor similar al obtenido con los marcadores de RAPD. No obstante, al no tener información sobre el origen de ambas variedades no se puede afirmar que estén emparentadas (figura 9).

También se obtienen coeficientes de similitud altos entre las variedades F13 y F16, con una similitud mayor del 95%. Es probable que estas dos variedades tengan un origen similar porque pertenecen al mismo obtentor, pero no se puede determinar porque no pertenecen al mismo programa de mejora (tabla 14).



**Figura 9.** Dendrograma obtenido combinando los resultados de los marcadores ISSR en fresa.

El color amarillo corresponde a las muestras pertenecientes al programa 1 del obtentor 1, el rojo al programa 2 del obtentor 1, el azul al programa 3 del obtentor 1, el gris al programa 4 del obtentor 1, el morado al programa 5 del obtentor 2, el rosa al programa 6 del obtentor 2 y el verde a las muestras de las cuales no se dispone de información sobre su origen (tabla 2).

En este trabajo se han obtenido conclusiones similares a las obtenidas por Arnau et al. (2003), quienes emplearon dieciocho cebadores para realizar la diferenciación varietal de fresa de distintos orígenes geográficos y genéticos, que definían los marcadores ISSR como una técnica sencilla, rápida, económica, discriminante y fiable para este tipo de procedimientos. Cabe resaltar que en el trabajo mencionado, se obtuvieron entre 15 y 36 fragmentos polimórficos en cada uno de los marcadores utilizados para el análisis de los 30 genotipos de fresa. Estos resultados son muy dispares a los expuestos en el presente trabajo, en el que se han obtenido entre 3 y 16 fragmentos polimórficos. Este resultado podría deberse, a que en nuestro caso las variedades de fresa analizadas tienen un origen similar, ya que la mayoría de ellas pertenecen a 2 obtentores. Además, en el proyecto de Arnau et al. (2003), se realizó la separación de los fragmentos mediante una electroforesis en gel de acrilamida, que es más discriminante que el gel de agarosa utilizado en este caso. Probablemente, si se hubiese utilizado acrilamida en el presente trabajo se habrían obtenido un mayor número de fragmentos amplificados y unos resultados de mayor fiabilidad y robustez, tanto en los marcadores RAPD como en los marcadores ISSR.

Finalmente, cabe resaltar, que nuestros resultados encajan perfectamente con los presentados por Kuras et al. (2004) y Korbin et al. (2002) quienes consideran a los marcadores ISSR una herramienta más discriminante y más reproducible que los RAPDs y sugieren que combinar ambos tipos de marcadores podría ser una forma útil de obtener más información y poder superar las limitaciones técnicas que ambos presentan.

Tabla 14. Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR en fresa.

	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F33	F34	F35	F36	F37	F38		
F01	1,00	0,60	0,62	0,70	0,61	0,64	0,44	0,41	0,44	0,48	0,39	0,41	0,48	0,46	0,40	0,50	0,48	0,28	0,39	0,31	0,37	0,41	0,31	0,48	0,48	0,46	0,48	0,40	0,48	0,52	0,40	0,55	0,55	0,41	0,50	0,50	0,56		
F02		1,00	0,62	0,70	0,54	0,57	0,44	0,41	0,39	0,42	0,39	0,41	0,42	0,36	0,40	0,44	0,37	0,28	0,39	0,36	0,37	0,46	0,42	0,48	0,36	0,46	0,36	0,40	0,37	0,52	0,40	0,48	0,42	0,41	0,50	0,40	0,45		
F03			1,00	0,64	0,77	0,73	0,65	0,60	0,52	0,57	0,52	0,48	0,50	0,54	0,42	0,46	0,50	0,43	0,58	0,48	0,54	0,48	0,50	0,57	0,50	0,61	0,50	0,48	0,50	0,55	0,54	0,64	0,57	0,54	0,58	0,47	0,47		
F04				1,00	0,56	0,65	0,46	0,43	0,46	0,50	0,41	0,54	0,56	0,43	0,54	0,58	0,44	0,34	0,41	0,33	0,39	0,43	0,39	0,50	0,50	0,54	0,50	0,54	0,44	0,62	0,61	0,57	0,50	0,43	0,52	0,52	0,57		
F05					1,00	0,64	0,71	0,65	0,58	0,63	0,63	0,59	0,62	0,65	0,48	0,58	0,56	0,48	0,69	0,54	0,59	0,43	0,50	0,56	0,50	0,60	0,44	0,43	0,45	0,48	0,48	0,56	0,56	0,53	0,52	0,52	0,47		
F06						1,00	0,74	0,68	0,67	0,73	0,59	0,56	0,64	0,68	0,56	0,60	0,64	0,50	0,65	0,56	0,55	0,50	0,52	0,52	0,46	0,50	0,46	0,44	0,52	0,50	0,50	0,54	0,52	0,45	0,54	0,48	0,59		
F07							1,00	0,75	0,67	0,73	0,72	0,68	0,64	0,68	0,56	0,60	0,64	0,61	0,79	0,62	0,67	0,50	0,58	0,52	0,46	0,56	0,41	0,39	0,41	0,44	0,44	0,52	0,52	0,56	0,48	0,48	0,48		
F08								1,00	0,75	0,74	0,73	0,69	0,72	0,76	0,71	0,68	0,65	0,62	0,80	0,76	0,74	0,47	0,60	0,48	0,43	0,52	0,43	0,41	0,43	0,46	0,46	0,54	0,48	0,47	0,50	0,41	0,46		
F09									1,00	0,90	0,79	0,68	0,71	0,75	0,77	0,74	0,64	0,55	0,72	0,62	0,61	0,40	0,65	0,52	0,46	0,50	0,46	0,44	0,46	0,44	0,50	0,58	0,52	0,45	0,48	0,44	0,48		
F10										1,00	0,71	0,67	0,70	0,74	0,76	0,73	0,70	0,54	0,71	0,60	0,59	0,43	0,71	0,57	0,50	0,54	0,40	0,48	0,50	0,48	0,54	0,70	0,57	0,48	0,52	0,47	0,47		
F11											1,00	0,80	0,63	0,67	0,62	0,65	0,63	0,60	0,84	0,61	0,66	0,50	0,58	0,52	0,46	0,56	0,41	0,45	0,47	0,44	0,45	0,52	0,52	0,50	0,48	0,44	0,44		
F12												1,00	0,72	0,63	0,71	0,75	0,65	0,62	0,80	0,57	0,62	0,47	0,54	0,54	0,54	0,64	0,48	0,46	0,39	0,52	0,52	0,54	0,54	0,52	0,50	0,50	0,46		
F13													1,00	0,79	0,82	0,95	0,68	0,53	0,69	0,59	0,59	0,39	0,56	0,50	0,50	0,54	0,50	0,54	0,40	0,54	0,54	0,56	0,50	0,43	0,46	0,52	0,52		
F14														1,00	0,64	0,75	0,65	0,62	0,73	0,76	0,62	0,38	0,54	0,48	0,48	0,46	0,48	0,41	0,48	0,41	0,46	0,54	0,48	0,42	0,45	0,46	0,46		
F15															1,00	0,86	0,60	0,47	0,62	0,52	0,52	0,41	0,61	0,48	0,48	0,52	0,48	0,52	0,38	0,52	0,52	0,54	0,48	0,41	0,44	0,45	0,50		
F16																1,00	0,64	0,50	0,65	0,56	0,55	0,40	0,58	0,52	0,52	0,56	0,52	0,56	0,41	0,57	0,56	0,58	0,52	0,45	0,48	0,53	0,53		
F17																	1,00	0,59	0,76	0,65	0,70	0,54	0,56	0,56	0,44	0,48	0,50	0,43	0,45	0,42	0,43	0,56	0,50	0,48	0,46	0,47	0,47		
F18																		1,00	0,66	0,62	0,72	0,47	0,43	0,39	0,34	0,38	0,39	0,33	0,44	0,32	0,38	0,39	0,34	0,47	0,41	0,42	0,42		
F19																			1,00	0,73	0,78	0,50	0,64	0,52	0,46	0,56	0,41	0,40	0,42	0,44	0,45	0,52	0,52	0,50	0,48	0,44	0,44		
F20																				1,00	0,74	0,47	0,60	0,48	0,38	0,41	0,43	0,32	0,43	0,36	0,47	0,43	0,38	0,42	0,40	0,37	0,37		
F21																					1,00	0,57	0,54	0,48	0,39	0,47	0,43	0,38	0,44	0,41	0,42	0,48	0,43	0,52	0,45	0,46	0,46		
F22																						1,00	0,43	0,43	0,29	0,37	0,33	0,37	0,34	0,31	0,32	0,38	0,33	0,42	0,36	0,37	0,66		
F23																							1,00	0,50	0,39	0,48	0,39	0,42	0,39	0,48	0,48	0,50	0,44	0,43	0,46	0,38	0,38		
F24																								1,00	0,71	0,76	0,71	0,61	0,64	0,62	0,61	0,80	0,80	0,74	0,65	0,69	0,38		
F25																									1,00	0,85	0,90	0,68	0,70	0,70	0,61	0,80	0,90	0,90	0,67	0,65	0,69	0,38	
F26																										1,00	0,76	0,73	0,60	0,75	0,65	0,85	0,85	0,78	0,77	0,73	0,41		
F27																											1,00	0,68	0,77	0,70	0,61	0,80	0,80	0,67	0,65	0,69	0,38		
F28																												1,00	0,67	0,67	0,73	0,76	0,68	0,64	0,70	0,67	0,67	0,45	
F29																													1,00	0,61	0,54	0,70	0,70	0,65	0,71	0,68	0,38		
F30																														1,00	0,67	0,70	0,70	0,58	0,71	0,62	0,40		
F31																															1,00	0,68	0,61	0,52	0,56	0,55	0,41		
F33																																1,00	0,90	0,74	0,81	0,69	0,42		
F34																																	1,00	0,74	0,73	0,69	0,38		
F35																																			1,00	0,83	0,85	0,41	
F36																																				1,00	0,77	0,44	
F37																																					1,00	0,53	
F38																																							1,00

### 4.1.3. Amplificación individual de los marcadores microsatélites en fresa

La amplificación de los microsatélites por separado permitió evaluar su robustez y su poder discriminatorio, ya que permitió identificar como iguales aquellas muestras analizadas por duplicado y distinguir las que eran diferentes.

También permitió determinar unas condiciones unificadas con las que fuese posible el óptimo funcionamiento de los microsatélites utilizados y comprobar que era posible la realización del multiplexado en los marcadores, ya que no se obtuvieron fragmentos del mismo tamaño en marcadores con el mismo fluoróforo.

Tal y como se muestra en la tabla 15, no hubo solapes de tamaño en microsatélites marcados con el mismo fluoróforo y se permitió la amplificación de todos ellos en las mismas condiciones.

Además, facilitó el ajuste de las concentraciones de los cebadores para obtener señales de fluorescencia similares, ya que en aquellos que tenían el fluoróforo VIC (M4, M5 y M6), se obtenía una intensidad de fluorescencia mucho menor que la obtenida con NED (M1, M2 y M3) y 6-FAM (M7, M8 y M9).

**Tabla 15.** Rango del tamaño de los alelos obtenidos por los microsatélites en fresa.

Marcador	Tamaño de alelo en fresa*
M1	216-241
M2	149-159
M3	75-123
M4	253-280
M5	202-226
M6	105-125
M7	317-339
M8	206-222
M9	98-124

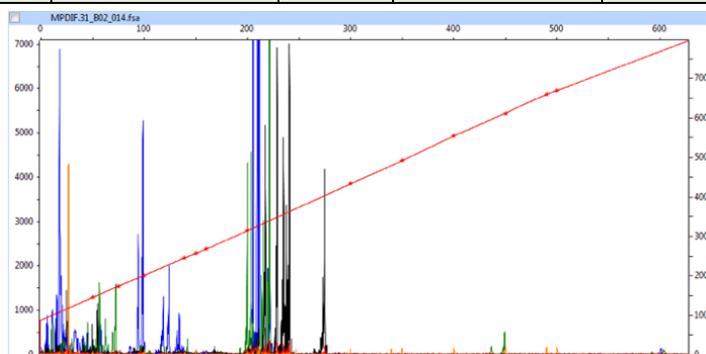
\*: rango del tamaño de alelo obtenido a partir de las dos variedades utilizadas para la realización de la amplificación individual de los marcadores en fresa.

### 4.1.4. Amplificación multiplexada de los marcadores microsatélites en fresa

En la tabla 16 y en la figura 10 se observan los resultados obtenidos tras realizar la amplificación por PCR utilizando los marcadores M1, M5, M8 y M9 en una única reacción. Se escogieron estos marcadores por ser el conjunto de microsatélites más informativo de las combinaciones probadas, y porque son marcadores polimórficos, robustos y compatibles entre ellos en la misma reacción.

**Tabla 16.** Resultados obtenidos con el conjunto multiplexado de microsatélites en fresa.

Nº total de fragmentos amplificados	Bandas polimórficas (PB)	% PB	Nº genotipos distinguidos	% genotipos distinguidos	Reproducibilidad
54	53	98	37	100	Alta



**Figura 10.** Electroferograma obtenido tras la amplificación multiplexada de los microsatélites en fresa.

En el total de las variedades analizadas se consiguieron amplificar 54 fragmentos y todos ellos resultaron ser polimórficos a excepción de uno de ellos, que produjo un producto de amplificación de 210 pares de bases que se encontraba en todas las variedades (ver anexo, tablas 4-7). Además,

en una única reacción, se consiguieron distinguir todos los genotipos diferentes analizados y se identificaron como iguales las variedades F4 y F4D, F15 y F15D, F34 y F34D y F35 y F35D que fueron analizadas por duplicado, en las que se obtuvo exactamente el mismo patrón de picos. Estos resultados demuestran que se trata de una herramienta fiable, robusta, sensible y reproducible.

**Tabla 17.** Comparación del número de alelos obtenidos en cada uno de los marcadores respecto a los identificados en la bibliografía consultada.

Marcador	Número de alelos identificados en la bibliografía	Número de alelos identificados en este estudio
M1	25	18
M5	20	11
M8	7	16
M9	8-16	9

En cuanto al número de alelos obtenidos con cada marcador, destacamos el marcador M1, que ha conseguido identificar 18 alelos en las 37 variedades analizadas, pero que en el trabajo realizado por Honjo et al. (2011) al analizar un mayor número de cultivares, se consiguieron identificar 25 alelos. Se puede considerar como un marcador discriminante y altamente polimórfico (tabla 17).

Por otro lado, el microsatélite M5 ha conseguido amplificar 11 fragmentos, sin embargo, en el estudio de Rugienius et al. (2015), al analizarse más muestras, los fragmentos amplificados ascendieron a 20 (tabla 17).

En el caso del SSR M8, se consiguió detectar un número de alelos mayor respecto al del estudio de Yoon et al. (2012), en el que analizando 59 variedades de origen principalmente asiático se consiguieron identificar 8 alelos. En cambio, en este estudio se ha conseguido aumentar el número de alelos identificados a 16, obteniendo resultados más amplios y discriminantes para la diferenciación varietal en este estudio que en el estudio comparado (tabla 17).

Finalmente, con el marcador M9, el número de alelos reportado por la bibliografía variaba de 8 a 16. En este caso, se identificaron un número similar de alelos al estudio de Yoon et al. (2012) y poco más de la mitad de los alelos identificados por el grupo de Rugienius et al. (2015), en el que se analizaron un mayor número de variedades (tabla 17).

Este conjunto de marcadores, además de permitir diferenciar las variedades analizadas, ha permitido esclarecer las relaciones de parentesco existentes entre los distintos cultivares.

Se han podido diferenciar claramente dos grupos, que agrupan las variedades de los dos obtentores analizados. En un grupo se encuentran las variedades F03, F07, F08, F14, F15, F16, F18, F19, F20, F21, F23 y F29, y que pertenecen al mismo obtentor, junto con otras variedades de cuyo origen no se tienen ninguna información.

En el otro *cluster*, se encuentran las variedades F06, F24, F26, F27, F28, F33, F34, F35, F36, F37 y F38. Todas ellas pertenecen al mismo obtentor, a excepción de la muestra F06, que se trata de una variedad muy utilizada comercialmente que se habría podido emplear para la realización de algunos cruces. Las variedades F26 y F34 comparten un valor del coeficiente de similitud de 0,8, resultado similar al obtenido con los marcadores ISSR, que ya predecían la posible relación entre ambas. También entre las variedades F27 y F28 se ha obtenido un coeficiente de similitud de 0,8 y pertenecen al mismo programa de mejora que las variedades F24, F26, F35, F37 y F38 que se sitúan en la misma rama del dendrograma. En esta también aparecen las variedades F33, F34, F35 y F36, que aunque fueron obtenidas por el mismo obtentor en un programa de mejora distinto, la presencia de ancestros comunes podría haber influenciado la similitud entre los cultivos (tabla 18, figura 11).

Entre F07 y F08 existe una estrecha relación de parentesco porque comparten un coeficiente de similitud de 0,94 y pertenecen al mismo programa de mejora. Estos a su vez tienen un coeficiente

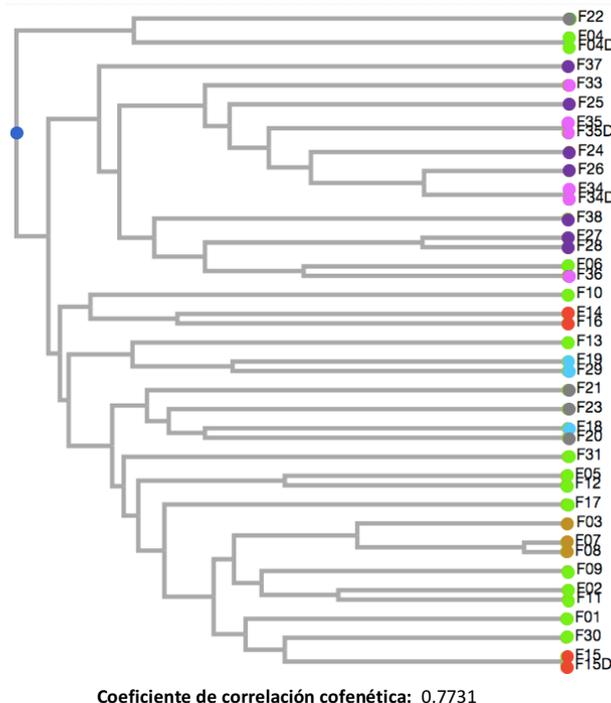
de similitud respecto a F03 de 0,74 y 0,68 respectivamente. De esta variedad no se tiene información acerca de su origen, pero probablemente esté estrechamente relacionada con los anteriores, ya que pertenecen al mismo obtentor (tabla 18).

Podrían tener también el mismo origen las variedades F19 y F29, que presentan un coeficiente de similitud de 0,54 y que pertenecen al mismo programa de mejora, al igual que la variedad F18 que se encuentra en este mismo grupo (tabla 18, figura 11).

De igual manera, se han podido esclarecer las relaciones de parentesco que existen entre las variedades F20, F21 y F23 que pertenecen al mismo obtentor y que parten de la misma rama del dendrograma. Sin embargo, la muestra F22 se ha situado en una rama muy alejada de las otras variedades de este mismo programa y de las variedades pertenecientes a este obtentor. El estudio de la divergencia genética a través de los coeficientes de similaridad o de dendrogramas podría ayudar a identificar parentales interesantes para la realización de cruces, por lo que este resultado, que demuestra la divergencia genética entre esta variedad y las otras, podría convertir esta muestra en un parental interesante para la obtención de híbridos con mayor heterocigosidad y mayor segregación durante la recombinación para la selección de individuos de interés (figura 11).

Se ha demostrado, como a través de este tipo de marcadores a diferencia de los resultados encontrados con los marcadores RAPD e ISSR, se han conseguido diferenciar todas las variedades evaluadas y se han podido establecer las posibles relaciones de parentesco que existen entre ellas, ya que, como se puede observar en la figura 11, diferencia claramente dos grupos pertenecientes a los dos obtentores del estudio que en los casos anteriores no se habían podido distinguir con claridad. Además, también han conseguido relacionar variedades originadas en el mismo programa de mejora como más próximas entre ellas.

Por último, en los resultados de diferenciación varietal de fresa consultados en la bibliografía (Lewers et al., 2005; Govan et al. 2008; Brunings et al., 2010; Honjo et al., 2011; Rugenius et al., 2015), los resultados son claros: los marcadores SSRs son en general los preferidos para este tipo de estudios, ya que aportan resultados discriminatorios, fiables, reproducibles, robustos y sensibles.



**Figura 11.** Dendrograma obtenido con los marcadores microsatélites en fresa.

El color amarillo corresponde a las muestras pertenecientes al programa 1 del obtentor 1, el rojo al programa 2 del obtentor 1, el azul al programa 3 del obtentor 1, el gris al programa 4 del obtentor 1, el morado al programa 5 del obtentor 2, el rosa al programa 6 del obtentor 2 y el verde a las muestras de las cuales no se dispone de información sobre su origen (tabla 2).

Tabla 18. Matriz de similitud obtenida tras los resultados de la electroforesis capilar de los marcadores microsatélites en fresa.

	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F33	F34	F35	F36	F37	F38
F01	1,00	0,52	0,52	0,18	0,48	0,29	0,50	0,5	0,50	0,39	0,46	0,39	0,42	0,26	0,57	0,36	0,44	0,33	0,27	0,35	0,19	0,28	0,20	0,32	0,30	0,30	0,13	0,17	0,28	0,54	0,38	0,37	0,29	0,19	0,19	0,39	0,33
F02		1,00	0,52	0,18	0,55	0,47	0,57	0,6	0,58	0,44	0,68	0,58	0,36	0,28	0,58	0,33	0,32	0,50	0,23	0,45	0,37	0,24	0,30	0,35	0,47	0,45	0,25	0,24	0,30	0,48	0,36	0,41	0,50	0,37	0,32	0,36	0,30
F03			1,00	0,18	0,35	0,47	0,74	0,68	0,50	0,30	0,52	0,36	0,23	0,21	0,50	0,22	0,44	0,43	0,32	0,53	0,30	0,37	0,30	0,42	0,40	0,32	0,25	0,31	0,30	0,32	0,46	0,41	0,36	0,37	0,47	0,36	0,40
F04				1,00	0,06	0,30	0,2	0,3	0,29	0,27	0,25	0,06	0,08	0,38	0,29	0,33	0,24	0,13	0,09	0,13	0,17	0,40	0,13	0,25	0,14	0,13	0,33	0,50	0,15	0,19	0,13	0,12	0,20	0,17	0,30	0,29	0,40
F05					1	0,26	0,4	0,4	0,45	0,32	0,41	0,61	0,41	0,16	0,38	0,23	0,28	0,38	0,24	0,33	0,32	0,19	0,32	0,24	0,29	0,33	0,19	0,18	0,21	0,36	0,32	0,30	0,32	0,19	0,20	0,26	0,19
F06						1,00	0,4	0,5	0,35	0,27	0,47	0,44	0,11	0,14	0,35	0,17	0,30	0,35	0,11	0,29	0,27	0,36	0,11	0,54	0,50	0,38	0,44	0,56	0,12	0,41	0,29	0,41	0,53	0,46	0,64	0,35	0,36
F07							1	0,94	0,55	0,35	0,50	0,35	0,26	0,26	0,55	0,28	0,48	0,41	0,23	0,43	0,29	0,42	0,29	0,33	0,32	0,25	0,24	0,29	0,24	0,46	0,39	0,28	0,29	0,29	0,44	0,35	0,35
F08								1	0,58	0,37	0,52	0,36	0,23	0,28	0,50	0,40	0,44	0,43	0,19	0,38	0,30	0,37	0,30	0,35	0,33	0,26	0,25	0,31	0,25	0,41	0,36	0,24	0,30	0,00	0,47	0,36	0,37
F09									1,00	0,33	0,58	0,40	0,24	0,31	0,47	0,37	0,41	0,47	0,21	0,42	0,33	0,33	0,33	0,20	0,30	0,29	0,13	0,19	0,27	0,45	0,29	0,26	0,33	0,14	0,28	0,27	0,26
F10										1,00	0,37	0,26	0,23	0,31	0,412	0,38	0,29	0,20	0,15	0,21	0,25	0,25	0,14	0,24	0,22	0,28	0,27	0,25	0,21	0,32	0,23	0,25	0,25	0,25	0,27	0,33	0,33
F11											1,00	0,50	0,36	0,28	0,58	0,33	0,38	0,50	0,32	0,45	0,37	0,30	0,30	0,42	0,47	0,53	0,25	0,31	0,40	0,55	0,46	0,35	0,58	0,30	0,32	0,50	0,37
F12												1,00	0,39	0,24	0,40	0,24	0,35	0,47	0,30	0,42	0,33	0,20	0,40	0,25	0,37	0,42	0,20	0,19	0,27	0,45	0,39	0,18	0,40	0,26	0,28	0,27	0,26
F13													1,00	0,26	0,44	0,31	0,39	0,24	0,29	0,30	0,28	0,14	0,39	0,18	0,26	0,35	0,08	0,08	0,41	0,32	0,38	0,19	0,29	0,14	0,07	0,29	0,19
F14														1,00	0,40	0,46	0,41	0,31	0,22	0,33	0,42	0,21	0,40	0,13	0,19	0,18	0,22	0,20	0,37	0,22	0,21	0,10	0,11	0,13	0,14	0,31	0,31
F15															1,00	0,44	0,55	0,40	0,20	0,56	0,33	0,33	0,33	0,39	0,37	0,421	0,20	0,27	0,32	0,61	0,44	0,28	0,40	0,26	0,28	0,47	0,33
F16																1,00	0,32	0,24	0,27	0,32	0,22	0,22	0,30	0,15	0,09	0,19	0,14	0,21	0,24	0,23	0,26	0,13	0,18	0,10	0,17	0,30	0,28
F17																	1,00	0,29	0,27	0,43	0,35	0,42	0,35	0,27	0,26	0,25	0,17	0,22	0,33	0,46	0,93	0,23	0,24	0,17	0,30	0,35	0,29
F18																		1,00	0,30	0,50	0,41	0,20	0,40	0,32	0,37	0,50	0,2	0,19	0,32	0,38	0,39	0,32	0,40	0,26	0,21	0,33	0,20
F19																			1,00	0,48	0,24	0,24	0,46	0,14	0,18	0,26	0,14	0,13	0,54	0,33	0,30	0,29	0,21	0,15	0,15	0,25	0,15
F20																				1,00	0,44	0,29	0,50	0,33	0,39	0,44	0,21	0,20	0,39	0,47	0,40	0,47	0,35	0,28	0,29	0,35	0,21
F21																					1,00	0,25	0,41	0,31	0,47	0,35	0,27	0,25	0,38	0,32	0,28	0,25	0,33	0,33	0,27	0,26	0,18
F22																						1,00	0,26	0,31	0,22	0,21	0,27	0,36	0,26	0,39	0,23	0,25	0,26	0,25	0,46	0,33	0,33
F23																							1,00	0,19	0,30	0,29	0,20	0,19	0,38	0,32	0,29	0,21	0,22	0,14	0,21	0,22	0,20
F24																								1,00	0,64	0,60	0,36	0,46	0,20	0,37	0,38	0,53	0,67	0,62	0,43	0,39	0,40
F25																									1,00	0,56	0,33	0,31	0,29	0,42	0,26	0,50	0,53	0,47	0,31	0,30	0,29
F26																										1,00	0,31	0,29	0,33	0,33	0,46	0,47	0,80	0,53	0,29	0,42	0,35
F27																											1,00	0,80	0,15	0,19	0,18	0,27	0,29	0,40	0,44	0,29	0,40
F28																												1,00	0,14	0,25	0,23	0,25	0,36	0,36	0,56	0,36	0,50
F29																													1,00	0,31	0,24	0,21	0,27	0,21	0,17	0,32	0,21
F30																														1,00	0,37	0,43	0,38	0,25	0,26	0,32	0,19
F31																															1,00	0,32	0,44	0,33	0,29	0,39	0,33
F33																																1,00	0,53	0,47	0,33	0,26	0,25
F34																																	1,00	0,60	0,44	0,40	0,33
F35																																		1,00	0,54	0,33	0,33
F36																																			1,00	0,35	0,46
F37																																				1,00	0,41
F38																																					1,00

## 4.2. DIFERENCIACIÓN VARIETAL EN FRAMBUESA

### 4.2.1. Marcadores ISSR

Los resultados obtenidos tras la amplificación por PCR con los marcadores ISSR en las variedades de frambuesa G1, G2, G3, G4, G5 y G6 han diferido respecto a los resultados logrados utilizando estos mismos marcadores en fresa.

**Tabla 19.** Resultados obtenidos con los marcadores de tipo ISSR en frambuesa.

Marcador	Nº total de fragmentos amplificados	Bandas polimórficas (PB)	% PB	Nº genotipos distinguidos	% genotipos distinguidos	Reproducibilidad
ISSR1	10	8	80	6	100	Media
ISSR2	13	7	54	5	83	Media
ISSR3	9	5	56	5	83	Media
ISSR4	15	12	80	6	100	Media

Tanto en el marcador ISSR1, ISSR2 como ISSR3 se han obtenido menos fragmentos amplificados que en fresa, pero esto se puede deber fundamentalmente a que en frambuesa se han analizado 6 variedades y en fresa se han analizado 37.

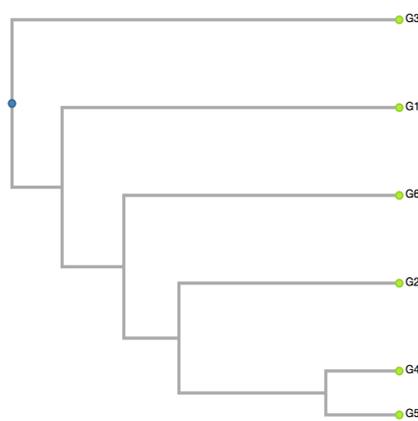
Además, los alelos identificados en estos tres casos han sido menos polimórficos que los identificados en fresa, ya que se ha conseguido un porcentaje de polimorfismo máximo del 80%. Se trata de un resultado esperable, ya que las variedades analizadas podrían presentar grandes similitudes genéticas porque provienen del mismo obtentor. Sin embargo, estos marcadores han demostrado ser altamente transferibles porque en frambuesa, ISSR1 e ISSR4, han permitido distinguir todas las variedades analizadas y los marcadores ISSR2 e ISSR3, 5 de las 6 muestras totales (tabla 19).

Cabe resaltar lo sucedido con el marcador ISSR4, que ha resultado amplificar un mayor número de fragmentos en frambuesa, estos han resultado ser más polimórficos y han logrado diferenciar las 6 variedades, mientras que en fresa sólo ha conseguido distinguir 1 variedad de las 37 analizadas (tabla 19).

Respecto a los coeficientes de similitud obtenidos, todas las muestras entre ellas han presentado coeficientes de similitud mayores a 0,5 y alcanzando valores de 0,7 entre G2 y G4 o G2 y G5 y de 0,91 entre G4 y G5. Sabemos, por la información proporcionada por el obtentor, que las variedades pertenecen al mismo programa de mejora y que además existe una relación de parentesco directa entre G4 y G5.

**Tabla 20.** Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR en frambuesa.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	1	0,51	0,50	0,67	0,64	0,56
G2		1	0,57	0,75	0,72	0,69
G3			1	0,57	0,50	0,54
G4				1	0,91	0,68
G5					1	0,65
G6						1



**Figura 12.** Dendrograma obtenido con los marcadores ISSR en frambuesa.

#### 4.2.2. Amplificación individual de los marcadores microsatélites en frambuesa

Para evaluar la transferibilidad de los marcadores en *Rubus idaeus* y poder comprobar que generaban producto de amplificación, se realizó la amplificación por PCR de los 9 marcadores microsatélites obtenidos a partir de *Fragaria x ananassa* en dos variedades de frambuesa amplificando éstas por duplicado.

En el caso de la frambuesa, es especialmente importante realizar la amplificación por separado antes de hacer la PCR multiplex, porque no existen datos bibliográficos que predigan el tamaño de alelo obtenido.

En este caso, sí que se obtuvieron productos de amplificación solapantes con marcadores del mismo fluoróforo. Estos fueron M1, cuyo tamaño coincidía con M2, y M8, que tenía alelos similares a M7.

Como se puede observar al comparar el tamaño de los alelos de la tabla 21 y el tamaño de los alelos de la tabla 15, en los marcadores M1, M3 y M5 se obtuvieron resultados similares, pero en todos los demás, el tamaño de alelo generado era muy diverso al obtenido en fresa y en algunos casos como en los productos de M6 y M8 se obtuvieron alelos de tamaños muy diferentes. Esto es debido a que estos marcadores no fueron desarrollados en frambuesa y por tanto no son tan específicos como en fresa.

**Tabla 21.** Rango del tamaño de los alelos obtenidos por los microsatélites en frambuesa.

Marcador	Tamaño de alelo en frambuesa
M1	203-220
M2	205
M3	109-112
M4	401-407
M5	219-227
M6	125; 323; 486
M7	194-220
M8	185-195; 237; 388
M9	231

\*: rango del tamaño de alelo obtenido a partir de las dos variedades utilizadas para la realización de la amplificación individual de los marcadores en fresa.

#### 4.2.3. Amplificación multiplexada de los marcadores microsatélites en frambuesa

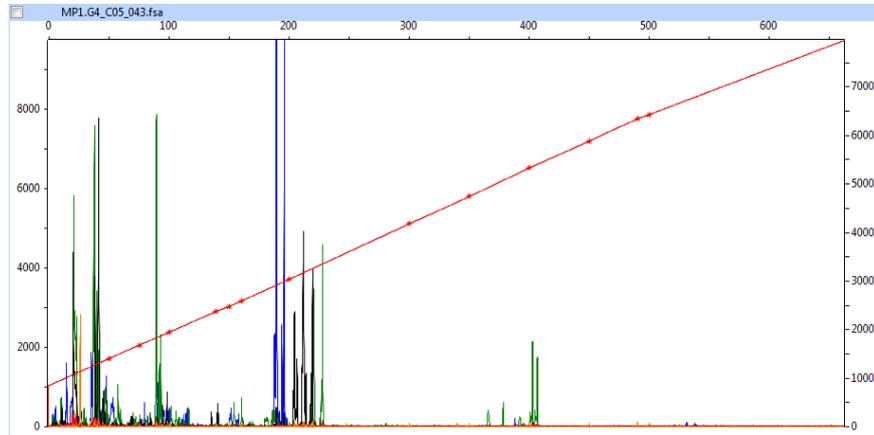
Dado que los marcadores utilizados no amplificaban un número de alelos tan alto como en fresa, se decidió realizar la PCR multiplex del máximo número de marcadores posible.

Se realizó el multiplexado de los marcadores M1, M3, M4, M5, M6, M7 y M8 (figura 13), porque en M1 se obtuvieron más alelos que en M2 y en M8 se logró un número más alto de productos de amplificación que en M9.

En este caso, el número total de fragmentos amplificados fue de 32, 31 de los cuales resultaron ser polimórficos y se consiguieron distinguir las 6 variedades de frambuesa evaluadas, por lo que se puede considerar este conjunto de marcadores como transferibles y discriminantes en frambuesa (tabla 22).

**Tabla 22.** Resultados obtenidos con el conjunto multiplexado de microsatélites en frambuesa.

Nº total de fragmentos amplificados	Bandas polimórficas (PB)	% PB	Nº genotipos distinguidos	% genotipos distinguidos	Reproducibilidad
32	31	97	6	100	Alta



**Figura 13.** Electroferograma obtenido tras la amplificación multiplexada de los marcadores microsatélites en frambuesa.

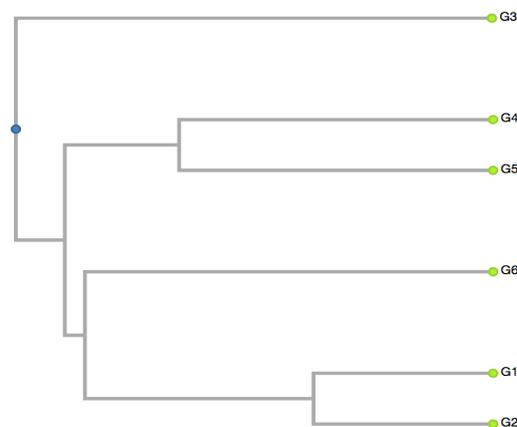
Respecto a los coeficientes de similitud obtenidos en frambuesa, destaca la posible relación de parentesco que puede existir entre G1 y G2 por presentar un coeficiente de similitud de 0,69, pero no tenemos constancia de que esta exista, por lo que no se puede afirmar ya que los marcadores no fueron desarrollados en este cultivo (tabla 23).

En el caso de G4 y G5, con los marcadores microsatélites se ha obtenido un coeficiente de similitud de 0,47 (tabla 23) que esclarece la asociación que intuían los marcadores ISSR (C.S: 0,91, tabla 20) y se sitúan en la misma rama del dendrograma (figura 14). No obstante, para poder saber si realmente existen similitudes entre el conjunto de las variedades analizadas, se debería haber estudiado una variedad de frambuesa de un obtentor distinto a las analizadas para que sirviese de *outgroup* en la realización del dendrograma.

Se debe resaltar que, en este caso, para informar sobre las relaciones de parentesco entre las variedades de frambuesa, los marcadores ISSR han resultado más informativos. Esto se debe a que no se necesita información previa para el desarrollo de los marcadores ISSR, por lo que son unos marcadores más generales y no se han desarrollado en ninguna especie en concreto. En cambio, los marcadores microsatélites fueron desarrollados en fresa y para establecer relaciones de parentesco en frambuesa no consiguen ser tan claros.

**Tabla 23.** Matriz de similitud obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores microsatélites en frambuesa.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	1	0,69	0,09	0,21	0,27	0,35
G2		1	0,13	0,25	0,40	0,32
G3			1	0,23	0,28	0,23
G4				1	0,47	0,30
G5					1	0,22
G6						1



**Figura 14.** Dendrograma obtenido con los marcadores microsatélites en frambuesa.

Los resultados obtenidos han determinado la transferibilidad de marcadores obtenidos en *Fragaria x ananassa* a *Rubus ideaus*. Esto apoya los resultados logrados por Bushakra et al. (2011), que identificaron 90 marcadores microsatélites comunes entre los dos géneros y que demostraron una relación 1:1 en los grupos de ligamiento en los que se encontraban.

Sin embargo, en la bibliografía consultada, existe controversia acerca de la transferibilidad de estos marcadores, ya que Longhi et al. (2014) definen los marcadores microsatélites como robustos, reproducibles y altamente transferibles entre los géneros *Fragaria*, *Rosa* y *Rubus*, y en cambio, Mouleh (2015) afirma que la transferibilidad de SSRs entre diferentes géneros dentro de la misma subfamilia es baja, a excepción de varios géneros de la subfamilia *Maloideae*, en la que hay mayor proximidad.

En nuestro caso, se han obtenido resultados que apoyan ambos puntos de vista, ya que el conjunto de marcadores implementado ha conseguido ser altamente transferible para la realización de estudios de diferenciación varietal, pero no ha conseguido esclarecer las relaciones de parentesco existentes entre las variedades de frambuesa. No obstante, estos resultados podrían haber variado al emplear estos marcadores microsatélites en otras especies, por las diferencias de sintenia existentes entre estas.

Por último, es importante resaltar que el presente estudio genético ha sido el primer trabajo de diferenciación varietal empleando marcadores de tipo microsatélites elaborado en la empresa Valgenetics S.L. Este proyecto podrá permitir estudiar la transferibilidad de estos marcadores en un mayor número de cultivos de la familia *Rosaceae* y servir como base para implantar este tipo de marcadores en otros cultivos de interés, ya que los microsatélites han demostrado ser una herramienta útil en este tipo de estudios.

Además, creemos que la utilización de un mayor número de marcadores tanto en fresa como en frambuesa, permitiría incrementar la fiabilidad y el poder discriminatorio de este tipo de ensayos, a pesar de que el conjunto de marcadores implementado ha demostrado ser altamente polimórfico e informativo.

### **4.3. MEJORA ASISTIDA POR MARCADORES**

#### **4.3.1. Marcadores asociados a caracteres agronómicos en fresa**

Se emplearon los marcadores M10 y M11 relacionados con los caracteres agronómicos de variedad de día corto y firmeza respectivamente. Las variedades empleadas para realizar este estudio fueron F33, F34, F35, F36 y F38. Tienen un origen similar porque fueron obtenidas en el mismo programa de mejora y se dispone de información sobre estos caracteres.

En el análisis realizado, la única diferencia observada en la comparación entre las variedades F33 y F35, que tenían distintos valores de firmeza, fue un pico observado en 118 pb que se encontraba en la variedad F33 pero que no aparecía en la variedad F35. Para poder afirmar que existe una asociación entre el marcador y el carácter, se deberían analizar un mayor número de variedades que tuviesen fenotipos extremos en cuanto a la firmeza, para comprobar si la diferencia observada es significativa, ya que comparando sólo dos variedades con fenotipos que no son suficientemente diferentes entre ellos, no podemos formar grupos fenotípicos ni determinar la asociación del marcador al carácter. Podría tratarse de un alelo polimórfico detectado entre ambas especies pero no estar asociado al carácter agronómico de estudio.

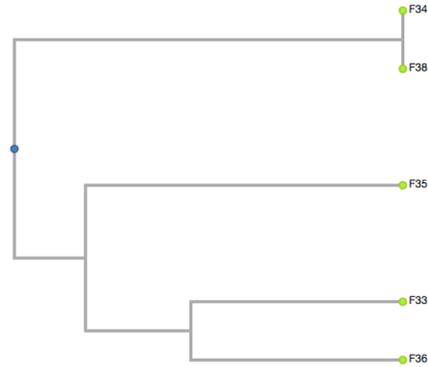
Al comparar las muestras F33, F35 y F36 (variedades de día corto), frente a F34 y F38 (variedades de día neutro) se observaron picos en 198 y 200 que aparecían en estas dos últimas muestras y que no se encontraban en las variedades de día corto (ver anexo, tabla 11). Sin embargo, al igual que en el caso anterior, no se puede determinar que exista una asociación clara entre el marcador y el carácter porque la diferencia es mínima y se deberían estudiar un mayor número de variedades pertenecientes a estos dos grupos fenotípicos para poder corroborar la asociación. Esto hicieron

Gor et al. (2016), que analizaron 287 muestras para descubrir la asociación de marcadores moleculares asociados con el día neutro en fresa y Michelmor et al. (1991) que analizaron dos poblaciones de 66 individuos con un carácter fenotípico y 80 individuos con el carácter fenotípico opuesto para determinar la asociación de un determinado marcador a la resistencia de oídio en lechuga.

Podemos concluir, por tanto, que podría existir cierta asociación, pero no se puede afirmar por el bajo número de genotipos y fenotipos extremos analizados.

**Tabla 24.** Matriz de similitud obtenida con los marcadores microsatélites relacionados a caracteres agronómicos.

	F33	F35	F36	F34	F38
F33	1,00	0,75	0,50	0,50	0,50
F35		1,00	0,75	0,67	0,67
F36			1,00	0,50	0,50
F34				1,00	1,00
F38					1,00



**Figura 15.** Dendrograma obtenido tras la amplificación de marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos.

A través de la búsqueda bibliográfica realizada, se supo que el marcador M11 podría estar asociado a la presencia de estolones y se localizaba adyacente al QTL responsable del contenido total de agua soluble. No obstante, estas características no se pudieron evaluar porque todas las variedades de la colección de Valgenetics S.L. tienen una alta presencia de estolones por tratarse de variedades comerciales y no se disponía de información acerca del contenido total de agua soluble.

Se podrían realizar estudios similares para determinar la asociación del marcador CFVCT024, que se encuentra en la posición final del mismo QTL que el marcador M11 asociado con variedades de día corto (Urrutia et al., 2015), pero analizando un mayor número de variedades correspondientes a los dos diferentes grupos de caracteres analizados y evaluando muestras con fenotipos extremos.

Del mismo modo, el marcador EMFn134, identificado en el mismo estudio que el anterior, se encuentra en la posición final del mismo QTL que M10 asociado a la presencia de estolones, por lo que se podría utilizar en estudios posteriores para evaluar la asociación a este carácter.

#### 4.3.2. Estudio de variedades resistentes a enfermedades

En este trabajo no se ha abordado el estudio de la asociación de marcadores moleculares a variedades resistentes, por tratarse un proceso largo, costoso y por las dificultades que presenta el cultivo de la fresa. Entre los motivos por los que es complicado obtener variedades resistentes resaltamos los siguientes.

El cultivo de la fresa dispone de un germoplasma estrecho en el que existen grandes similitudes genéticas entre las variedades comerciales (apartado 1.4), y esta alta tendencia a la endogamia puede ocasionar efectos deletéreos en el campo de la mejora y vulnerabilidad genética frente a plagas y enfermedades (Dale y Sjulín, 1990).

También es complicado obtener cultivos resistentes a enfermedades porque la resistencia a patógenos en fresa es principalmente de herencia poligénica y cuantitativa (Lewers et al., 2005; Zorrilla-Fontanesi et al., 2010), la fresa cultivada tiene un genoma octoploide y la identificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia es muy complicada.

Sin embargo, tal y como se explica en el apartado 1.6 de este trabajo, existen altos niveles de transferibilidad de los marcadores moleculares en los distintos niveles de ploidía de las especies de fresa y colinearidad entre los genomas diploides y octoploides de la fresa. Esto ha permitido la identificación de algunos genes de resistencia en la fresa cultivada.

A continuación, se detallan algunos trabajos a partir de los cuales, la empresa Valgenetics S.L. se podría basar para realizar nuevos proyectos y expandirse en el campo de la mejora genética vegetal.

El estudio elaborado por Pincot et al. (2018) permitió la identificación y el mapeado genético y físico del gen *FwI*, responsable de la resistencia al hongo foliar *Fusarium wilt*. Este trabajo, permitió la identificación de 14 SNPs que se encontraban en desequilibrio de ligamiento con el gen identificado y uno de estos marcadores predijo la resistencia a *Fusarium wilt* en el 97% de las muestras evaluadas. De igual manera, en el estudio realizado por Cockerton et al. (2018) se identificaron SNPs asociados a la resistencia a *Oidium fragariae*.

A partir de los marcadores SNP identificados por estos grupos de investigación, la empresa Valgenetics S.L. podría explorar la implantación de programas de mejora o la asistencia a programas de mejora, para la obtención de variedades resistentes a estas patologías y así obtener nuevas variedades de fresa cultivada.

Cabe resaltar que la identificación de estos SNPs fue posible por la utilización de los arrays comerciales Axiom® IStraw35 384HT y IStraw90 Axiom®, este último empleado también en el trabajo de Roach et al. (2016), en el que se determinó el locus *FaRF1* y dos QTLs que confieren resistencia a la enfermedad de la mancha angular de la hoja de fresa causada por *Xanthomonas fragariae*.

La presencia en el mercado de estos *arrays* comerciales, que han demostrado ser altamente informativos y que contienen más de noventa mil marcadores genéticos potenciales, podría permitir a la empresa Valgenetics S.L. detectar QTLs relacionados con caracteres complejos, como es el caso de aquellos vinculados a la resistencia a enfermedades, identificar caracteres agronómicos y nutricionales de alto valor económico, detectar nuevos SNPs para la realización de programas de mejora asistida por marcadores moleculares, impulsar la implantación de nuevos cultivos acelerando y aumentando la eficiencia del desarrollo de éste, identificar la presencia de marcadores importantes en el germoplasma de la fresa cultivada y utilizar información genética que permitiera descubrir germoplasma que se adaptase adecuadamente a unas condiciones climáticas específicas.

## **5. CONCLUSIONES**

---

## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que extraemos de este trabajo son:

1. El conjunto de marcadores microsatélites implantado es una herramienta sensible, reproducible y discriminatoria para la diferenciación de variedades de fresa, que puede ser de gran utilidad en la empresa Valgenetics S.L. para complementar los servicios que ofrece, ayudando al obtentor de nuevas variedades en el mantenimiento de la integridad genética del cultivo.
2. Los marcadores microsatélites han resultado ser más informativos, polimórficos, robustos y reproducibles que los marcadores RAPD e ISSR y han permitido esclarecer las relaciones de parentesco existentes entre las variedades de fresa analizadas.
3. Los marcadores microsatélites han demostrado ser transferibles en la diferenciación de variedades de frambuesa; sin embargo, los marcadores ISSR han resultado ser más informativos en la identificación de las relaciones de parentesco entre las muestras evaluadas.
4. Existen indicios de que haya una posible asociación entre el marcador molecular M11 y el carácter de día corto. No obstante, no se puede afirmar con seguridad por el bajo número de genotipos y fenotipos extremos evaluados.
5. Este proyecto ha servido como punto de partida para el desarrollo de estudios genéticos en la empresa Valgenetics S.L. y se han detallado posibles proyectos de interés futuro para la asistencia en programas de mejora.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRIN, S.; GASPARRINI, M.; FORBES-HERNANDEZ, T.; REBOREDO-RODRIGUEZ, P.; MEZZETTI, B.; VARELA-LÓPEZ, A.; GIAMPIERI, F. y BATTINO, M. (2016). Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), pp.4435-4449.
- ANTANAVICIUTE, L. (2016). *Genetic mapping and phenotyping plant characteristics, fruit quality and disease resistance traits in octoploid strawberry (Fragaria x ananassa)*. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. University of Reading. pp.293.
- ARNAU, G.; LALLEMAND, J. y BOURGOIN, M. (2003). Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica*, 129:69–79.
- ASHLEY, M.; WILK, J.; STYAN, S.; CRAFT, K.; JONES, K.; FELDHEIM, K.; LEWERS, K. y ASHMAN, T. (2003). High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (*Rosaceae*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 107(7), pp.1201-1207.
- BELL, J. y SIMPSON, D. (1994). The use of isoenzyme polymorphisms as an aid for cultivar identification in strawberry. *Euphytica*, 77(1-2), pp.113-117.
- BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT. UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (URV), 2002. *DendroUPGMA: A dendrogram construction utility*, visto el 18 de mayo de 2018. <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>
- BONET, J. (2010). Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en *Fragaria* diploide para la mejora del cultivo de fresa. Tesis Doctoral en Biotecnología. Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 241.
- BRUNINGS, A.; MOYER, C.; PERES, N. y FOLTA, K. (2010). Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. *Euphytica*, 173(1), pp.63-75.
- BUSHAKRA, J.; STEPHENS, M.; ATMADJAJA, A.; LEWERS, K.; SYMONDS, V.; UDALL, J.; CHAGNÉ, D.; BUCK, E. y GARDINER, S. (2012). Construction of black (*Rubus occidentalis*) and red (*R. idaeus*) raspberry linkage maps and their comparison to the genomes of strawberry, apple, and peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(2), pp.311-327.
- CHAMBERS, A., CARLE, S., NJUGUNA, W., CHAMALA, S., BASSIL, N., WHITAKER, V., BARBAZUK, W. y FOLTA, K. (2013). A genome-enabled, high-throughput, and multiplexed fingerprinting platform for strawberry (*Fragaria L.*). *Molecular Breeding*, 31(3), pp.615-629.
- CIVELLO, P.M.; POWELL, ALT.; SABEHAT, A. y BENNETT, AB. (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* 121(4):1273-1279.
- CIPRIANI, G. y TESTOLIN, R. (2004). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*. *Molecular Ecology Notes*, 4 pp.366-368.
- COCKERTON, H.M.; VICKERSTAFF, R.J.; KARLSTORN, A.; WILSON, F.; SOBCZYK, M.; HE, J.Q.; SARGENT, D.J.; PASSEY, A.J.; MCLEARY, K.J.; PAKOZDI, K.; HARRISON, N.; LUMBRERAS-MARTINEZ, M.; ANTANAVICIUTE, L.; SIMPSON, D.W y HARRISON, R.J. (2018). Identification of powdery mildew resistance QTL in *Fragaria x ananassa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), pp.111-127.
- CONGIU, L.; CHICCA, M.; CELLA, R.; ROSSI, R. y BERNACCHIA, G. (1999). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology*, 9(2), pp.229-232.
- DALE A y SJULIN T.M., 1990. Few cytoplasm contribute to North-American strawberry cultivars. *HortScience*, 25:1341–1342.

- DEGANI, C.; ROWLAND, L.J.; LEVI, A.; HORTYNSKI, J.A y GALLETTA, G.K. (1998). DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 102:247-253.
- DEGANI C.; ROWLAND L. J.; SAUNDERS J. A.; HOKANSON S. C.; ODGEN E. L.; GOLAN-GOLDHIRSH A. y GALLETA G. J. (2001). A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs and pedigree data. *Euphytica*, 117: 1–12
- DE VICENTE, M.C. y FULTON, T. (2003). *Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia.
- FEPEX (FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE ASOCIACIONES DE PRODUCTORES EXPORTADORES DE FRUTAS Y HORTALIZAS), (2014). Base de datos estadísticos, visto el 29 abril de 2018. <http://www.fepex.es/datos-delsector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas>
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, F.; ANTANAVICIUTE, L.; GOVAN. C.L. y SARGENT, D.J. (2011). Development of a multiplexed microsatellite set for fingerprinting red raspberry (*Rubus idaeus*) germplasm and its transferability to other *Rubus* species. *J Berry Res*, 1: 177–187.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, (2014), visto el 29 de abril de 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, (2016). visto el 29 de abril de 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.
- FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSATTI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D.; DALL'AGLIO, E. y VALÈ, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), pp.317-342.
- GARCIA, M.; ONTIVERO, M.; DIAZ RICCI, J. y CASTAGNARO, A. (2002). Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Plant Breeding*, 121(1), pp.76-80.
- GARRIDO, C.; CARBÚ, M.; FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, V.E. y CANTORAL, J.M. (2011). New insights in the study of strawberry fungal pathogens. *Genes, Genomes and Genomics*, 5(1), pp.24-39.
- GENOME DATABASE FOR ROSACEAE, (2018), visto el 6 de febrero de 2018. <https://www.rosaceae.org/>
- GIDONI, D.; ROM, M.; KUNIK, T.; ZUR, M.; IZSAK, E.; IZHAR, S. y FIRON, N. (1994). Strawberry-cultivar Identification using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Plant Breeding*, 113(4), pp.339-342.
- GIL-ARIZA, D.; AMAYA, I.; BOTELLA, M.; BLANCO, J.; CABALLERO, J.; LÓPEZ-ARANDA, J.; VALPUESTA, V. y SÁNCHEZ-SEVILLA, J. (2006). EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), pp.1195-1197.
- GOR, M.C.; MANTRI, N. y PANG, E. Application of subtracted gDNA microarray-assisted Bulk Segregant Analysis for rapid discovery of molecular markers associated with day-neutral-ity in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Nature* 10.1038.
- GOVAN, C.; SIMPSON, D.; JOHNSON, A.; TOBUTT, K. y SARGENT, D., (2008). A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. × ananassa* cultivars. *Molecular Breeding*, 22(4), pp.649-661.

- GUPTA, P.K. y VARSHNEY, R.K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113, 163–185
- HANCOCK, J.F.; FINN, C.E.; LUBY, J.J.; DALE, A.; CALLOW, P.W. y SERÇE, S. (2010). Reconstruction of the strawberry, *Fragaria × ananassa*, using genotypes of *F. virginiana* and *F. chiloensis*. *HortScience*, 45: 1006-1013.
- HANNUM, S. (2004). Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), pp.1-17.
- HARPSTER, M.; BRUMMELL, D. y DUNSMUIR, P. (1998). Expression Analysis of a Ripening-Specific, Auxin-Repressed Endo-1,4-β-Glucanase Gene in Strawberry. *Plant Physiology*, 118(4), pp.1307-1316.
- HARRISON, E.; MCQUEEN-MASON, S. y MANNING, K. (2001). Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), pp.1437-1446.
- HAYWARD, M.D.; BOSEMARK, N.O. y ROMAGOSA, I. (1993). *Plant Breeding. Principles and prospects*. Chapman & Hall. London.
- HEFFNER, E.; SORRELLS, M. y JANNINK, J. (2009). Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Science*, 49(1), p.1.
- HONJO, M.; NUNOME, T.; KATAOKA, S.; YANO, T.; YAMAZAKI, H.; HAMANO, M.; YUI, S. y MORISHITA, M., (2011). Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. *Breeding Science*, 61(4), pp.420-425.
- JANNINK, J.; LORENZ, A. y IWATA, H. (2010). Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics*, 9(2), pp.166-177.
- KOPS J, VAN HALL H.C. (1844) *Flora batava of of Afbeelding en beschrijving van Nederlandsche gewassen*. Gravenhage: Martinus Nijhoff. Amsterdam.
- KORBIN M., KURAS A. y URAWICZ E. (2002). Fruit plant germplasm characterization using molecular markers generated in RAPD and ISSR PCR. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7(2B) pp.785–794.
- KUMAR, L. (1999). DNA markers in plant improvement. *Biotechnology Advances*, 17(2-3), pp.143-182.
- KUNIHISA, M. (2010). Development of genome-specific DNA markers in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) and their use for cultivar identification. *Bull. Natl. Inst. Veg. & Tea Sci*, 9: 7–56.
- KURAS, A.; KORBIN, M. y ŻURAWICZ, E. (2004). Comparison of suitability of RAPD and ISSR techniques for determination of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) relationship. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(2), pp.189-193.
- LEWERS, K.S.; STYAN, S.M.N.; HOKANSON, S.C. y BASSIL, N.V. (2005). Strawberry GenBank-derived and genomic simple sequence repeat (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. *J Am Soc Hort Sci*, 130:102–115.
- LONGHI, S.; GIONGO, L.; BUTI, M.; SURBANOVSKI, N.; VIOLA, R.; VELASCO, R.; WARD, J. y SARGENT, D. (2014). Molecular genetics and genomics of the *Rosoideae*: state of the art and future perspectives. *Horticulture Research*, 1(1).
- LÓPEZ, M. (2009). *La fresa de Huelva*. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Andalucía.
- MACPHERSON, J.M.; ECKSTEIN, P.E.; SCOLES, G.J. y GAJADHAR, A.A. (1993). Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 293–299.

- MARTIN, R. y TZANETAKIS, I. (2006). Characterization and Recent Advances in Detection of Strawberry Viruses. *Plant Disease*, 90(4), pp.384-396.
- MARULANDA, M.; LÓPEZ, A. y URIBE, M. (2012). Molecular characterization of the Andean blackberry, *Rubus glaucus*, using SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), pp.322-331.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. y KESSELI, V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. Vol. 88. pp. 9828-9832.
- MILELLA, L., SALUZZI, D., LAPELOSA, M., BERTINO, G., SPADA, P., GRECO, I. y MARTELLI, G. (2006). Relationships between an Italian Strawberry Ecotype and its Ancestor using RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(8), pp.1715-1720.
- MOULEH, M.M.A. (2015). *Desarrollo y transferibilidad de los microsatélites en Prunus y su aplicación en estudios de variabilidad*. Tesis doctoral en Biotecnología. Universitat de Lleida pp. 217.
- NADEEM, M., NAWAZ, M., SHAHID, M., DOĞAN, Y., COMERTPAY, G., YILDIZ, M., HATIPOĞLU, R., AHMAD, F., ALSALEH, A., LABHANE, N., ÖZKAN, H., CHUNG, G. y BALLOCH, F. (2017). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), pp.261-285.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, (2018), visto el 2 de febrero de 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- NIELSEN, J. y LOVELL, P., 2000. Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28:89-96.
- NJUGUNA, W.; LISTON, A.; CRONN, R.; ASHMAN, T.L. y BASSIL, N. (2013). INSIGHTS into phylogeny, sex function and age of *Fragaria* based on whole chloroplast genome sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 17–29.
- PASCUAL, A.N.T; SUZUKI, K.M.; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ L.M.L. y SOFIA, S.H. (2006). Evaluation of the RAPD profiles from different Body Parts of *Euglossa pleosticta* Dressler Male Bees (Hymenoptera: Apidae, Euglossina). *Neotropical Entomology* 35(6), pp. 811-817.
- PÉREZ, T., J.A.; ALBORNOZ y DOMÊNGUEZ, A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol. Ecol.* 7: 1347-1357.
- PINCOT, D., POORTEN, T., HARDIGAN, M., HARSHMAN, J., ACHARYA, C., COLE, G., GORDON, T., STUEVEN, M., EDGER, P. y KNAPP, S. (2018). Genome-Wide Association Mapping Uncovers Fw1, a Dominant Gene Conferring Resistance to Fusarium Wilt in Strawberry. *Genes, Genomes and Genetics*, 8(5), pp.1817-1828.
- POTTER, D.; ERIKSSON, T.; EVANS, R.C.; OH, S.H.; SMEDMARK, J.E.E.; MORGAN, D.R.; KERR, M.; ROBERTSON, K.R.; ARSENAULT, M.; DICKINSON, T.A. y CAMPBELL, C.S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 266: 5-43.
- RABOUAM, C.; COMES, A.M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT F.F.; PERIQUET G. y BIGOT, Y. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Mol. Ecol.* 8: 493-503.
- RAFALSKI, A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2), pp.94-100.

- ROACH, J.; VERMA, S.; PERES, N.; JAMIESON, A.; VAN DE WEG, W.; BINK, M.; BASSIL, N.; LEE, S. y WHITAKER, V. (2016). FaRXf1: a locus conferring resistance to angular leaf spot caused by *Xanthomonas fragariae* in octoploid strawberry. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(6), pp.1191-1201.
- RUGIENIUS, R., ŠIKŠNIANIENĖ, J., FRERCKS, B., STANIENĖ, G., STEPULAITIENĖ, I., HAIMI, P. y STANYŠ, V. (2015). Characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars and hybrid clones using SSR and AFLP markers. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(2), pp.177-184.
- SARGENT, D.; CLARKE, J.; SIMPSON, D.; TOBUTT, K.; ARÚS, P.; MONFORT, A.; VILANOVA, S.; DENOYES-ROTHAN, B.; ROUSSEAU, M.; FOLTA, K.; BASSIL, N. y BATTEY, N. (2006). An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(7), pp.1349-1359.
- SARGENT, D.; CIPRIANI, G.; VILANOVA, S.; GIL-ARIZA, D.; ARÚS, P.; SIMPSON, D.; TOBUTT, K. y MONFORT, A. (2008). The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome*, 51(2), pp.120-127.
- URRUTIA, M.; BONET, J.; ARÚS, P. y MONFORT, A. (2015). A near-isogenic line (NIL) collection in diploid strawberry and its use in the genetic analysis of morphologic, phenotypic and nutritional characters. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), pp.1261-1275.
- VARSHNEY, R.; GRANER, A. y SORRELLS, M. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), pp.48-55.
- WELSH, J. y MCCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24), pp.7213-7218.
- WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, J. y TINGEY, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), pp.6531-6535.
- XU, Y. y CROUCH, J. (2008). Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. *Crop Science*, 48(2), p.391.
- YOON, M., MOE, K., KIM, D., RHO, I., KIM, S., KIM, K., WON, M. y CHUNG, J. (2012). Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) using SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(2).
- ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M.; CHATTERJEE, A.; VINSON, J. y BAGCHI, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), pp.675-683.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L. y PATARNELLO, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1), pp.1-16.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. y LABUDA, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), pp.176-183.
- ZHANG, C.; XU, W.; ZHAI, Z.; LUO, Y.; YAN, X.; ZHANG, N. y HUANG, K. (2011). Universal Primer-Multiplex-Polymerase Chain Reaction (UP-M-PCR) and Capillary Electrophoresis-Laser-Induced Fluorescence Analysis for the Simultaneous Detection of Six Genetically Modified Maize Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), pp.5188-5194.
- ZORRILLA-FONTANESI, Y.; CABEZA, A.; TORRES, A.; BOTELLA, M.; VALPUESTA, V., MONFORT, A.; SÁNCHEZ-SEVILLA, J. y AMAYA, I. (2010). Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the *Rosoideae* subfamily. *Molecular Breeding*, 27(2), pp.137-156.

## **7. ANEXOS**

---

Tabla 1. Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores RAPD en fresa.

	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F33	F34	F35	F36	F37	F38			
RAPD1	1429	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0			
	1214	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
	1000	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
	900	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	
	700	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1		
	600	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	533	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1		
	475	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	350	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
RAPD2	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
RAPD3	1250	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	1000	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	800	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	750	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	700	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
	671	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
	550	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	400	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

**Tabla 2.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR1 e ISSR2 en fresa.

	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F33	F34	F35	F36	F37	F38		
ISSR1	1785	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0		
	1400	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1		
	1350	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
	1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1150	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
	910	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	
	850	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	810	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	760	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	730	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	640	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ISSR2	1833	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
	1300	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	1150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1000	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	970	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	880	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	820	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	700	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	
	589	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	420	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	300	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

**Tabla 3.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR3 e ISSR4 en fresa.

	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F33	F34	F35	F36	F37	F38		
ISSR3	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	1917	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	1400	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	
	1300	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	880	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	790	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
457	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
ISSR4	1313	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
	1188	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	675	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

**Tabla 4.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (I).

	93	94	98	99	118	123	124	126	128	200	202	202	203	203	204	204	206	208	209	210	210	212	214	214	216	215	217	216	217	218	220
F01	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
F02	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
F03	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
F04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F04D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F05	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
F06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F07	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F08	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F09	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
F10	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
F11	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
F12	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
F13	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
F14	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F15	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F15D	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F16	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F17	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
F18	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
F19	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
F20	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F21		0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
F23	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1

**Tabla 5.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (II).

	220	221	222	222	226	226	228	229	229	231	233	234	235	236	237	238	239	240	241	243	263	273	275
F01	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
F02	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
F03	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
F04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F04D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F05	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
F06	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F07	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
F08	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
F09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
F10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F11	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
F12	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F13	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
F14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
F15D	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
F16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F17	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
F18	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
F19	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
F20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
F21	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
F23	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F24	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0

**Tabla 6.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (III).

	93	94	98	99	118	123	124	126	128	200	202	202	203	203	204	204	206	208	209	210	210	212	214	214	216	215	217	216	217	218	220
F25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
F27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F29	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
F30	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
F31	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1
F33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
F34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
F34D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
F35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
F35D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
F36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F37	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

**Tabla 7.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en fresa (IV).

	220	221	222	222	226	226	228	229	229	231	233	234	235	236	237	238	239	240	241	243	263	273	275	
<b>F25</b>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>F26</b>	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>F27</b>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>F28</b>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>F29</b>	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>F30</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
<b>F31</b>	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1
<b>F33</b>	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
<b>F34</b>	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>F34D</b>	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>F35</b>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>F35D</b>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>F36</b>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>F37</b>	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>F38</b>	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

**Tabla 8.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR1 e ISSR2 en frambuesa.

		G1	G2	G3	G4	G5	G6
ISSR1	1240	1	0	0	0	0	0
	1179	0	1	1	1	1	1
	987	0	1	0	1	1	1
	914	1	1	1	1	1	1
	805	1	0	0	0	1	0
	785	1	0	0	1	1	1
	709	1	0	0	1	1	0
	640	0	1	1	1	1	1
	460	1	1	1	1	1	1
	395	1	0	0	0	0	0
	ISSR2	1347	0	0	1	0	0
1313		1	1	0	1	1	1
1155		1	1	1	1	1	0
828		1	1	1	1	1	1
728		1	0	1	1	1	0
692		0	1	0	0	0	0
658		1	1	1	1	1	1
609		0	0	0	0	0	1
564		1	0	0	0	0	1
496		1	1	1	1	1	1
305		1	1	1	1	1	1
268		1	1	1	1	1	1
262		1	1	1	1	1	1

**Tabla 9.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis con los marcadores ISSR3 e ISSR4 en frambuesa.

		G1	G2	G3	G4	G5	G6
ISSR3	1317	1	1	1	1	1	1
	1145	1	1	1	1	1	1
	1057	0	1	0	1	1	1
	816	0	0	1	0	0	0
	724	1	1	1	1	1	1
	605	1	1	0	1	1	0
	548	1	1	1	1	1	1
	486	0	1	0	1	1	0
	333	1	1	1	1	0	1
	ISSR4	2038	1	0	0	0	0
1184		1	1	1	1	1	1
1048		1	0	1	1	0	0
979		1	0	0	0	0	0
855		1	1	0	1	1	1
767		0	1	1	0	0	1
669		1	0	0	1	1	1
584		1	1	1	1	1	1
553		0	1	0	0	0	0
510		0	0	1	0	0	0
433		1	1	0	1	1	1
399		1	1	1	1	1	1
339		0	0	0	1	1	0
288		0	0	0	0	0	1
226	0	1	0	1	1	0	

**Tabla 10.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con el conjunto de marcadores microsatélites multiplexados en frambuesa.

	89	93	151	154	168	168	178	188	189	194	195	196	196	203	204	206	211	212	216	218	219	219	220	221	223	228	252	254	256	402	406	421
G1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
G2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
G3	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
G4	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
G5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
G6	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1

**Tabla 11.** Matriz binaria obtenida a partir de los resultados de la electroforesis capilar con los marcadores microsatélites relacionados con caracteres agronómicos.

	118	126	168	169	170	171	198	200
F33	1	1	1	1	1	0	0	0
F35	0	1	1	1	1	1	0	0
F36	-	-	1	0	1	1	0	0
F34	-	-	1	1	1	1	1	1
F38	-	-	1	1	1	1	1	1