



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MORA DE ZONAS ALTO ANDINAS
DEL ECUADOR

AUTORA

Amalia Patricia Haro Villacrés

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MORA DE ZONAS ALTO ANDINAS
DEL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor guía

Dr. Luis Eduardo Morillo Velasteguí

Autora

Amalia Patricia Haro Villacrés

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Caracterización molecular de mora de zonas alto andinas del Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante Amalia Patricia Haro Villacrés, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Luis Eduardo Morillo Velastegui

Doctor en Recursos Fitogenéticos e Interacciones Biológicas

CI: 1708207632

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Caracterización molecular de mora de zonas alto andinas del Ecuador, de la estudiante Amalia Patricia Haro Villacrés, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 1718092701

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondiente y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

Amalia Patricia Haro Villacrés

CI: 1803720877

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al PhD Eduardo Morillo, director de biotecnología del INIAP, A la Ing. Johanna Buitrón por su enseñanzas y apoyo.

Agradezco al Msc. Fernando Rivas por su paciencia y motivación.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi madre y mis abuelas que siempre me apoyaron y me permitieron seguir adelante. A mis amigos que celebraron cada uno de mis logros, y me dieron ánimos para culminar cada fase.

RESUMEN

El género *Rubus* agrupa especies pertenecientes a las rosáceas que incluyen moras y frambuesas. El cultivo de mora se ha centrado en la mora de castilla, la cual ha incrementado con los años su área de cultivo siendo uno de los frutales más importantes para la economía nacional. Sin embargo, se ha reportado pérdidas importantes en los cultivos, en los cuales no se ha identificado un agente causal específico. Las principales investigaciones sobre el género se han centrado en estudios fisicoquímicos del fruto, manejo agrícola y en menor medida a la caracterización molecular. Los estudios de caracterización molecular permiten un mejor manejo de los recursos genéticos, ya que establecen conocimientos básicos sobre las relaciones genéticas, procesos de pérdida de diversidad, al igual que el flujo de genes entre las especies. Este conocimiento, a su vez permite establecer futuros programas de conservación y mejoramiento, razón por la cual el presente trabajo busca caracterizar la diversidad genética de moras de zonas alto andinas del Ecuador, utilizando marcadores moleculares microsatélites. Se caracterizaron molecularmente un total de 135 accesiones de moras, cultivadas y silvestres. En una primera fase, se estandarizaron las condiciones de PCR para 20 marcadores microsatélites reportadas para diversas especies del género *Rubus*. En una segunda fase se analizaron los polimorfismo de estos 20 microsatélites, donde se obtuvo un índice polimórfico promedio elevado (0,624), identificándose un total de 180 alelos, y una heterocigocis promedio observada de 0,434, representada en su mayoría por las especies silvestres del género *Rubus*. Mediante los análisis de asignación realizados en la especie *R. glaucus*, la cual se agrupó de manera diferenciada en comparación con el resto de moras analizadas, se identificó la conformación de dos grupos genéticos. Sin embargo, estas se encuentran estrechamente relacionadas, y en los análisis de variabilidad molecular se demuestra que tienen una mayor tendencia a la homocigocis y está estrechamente relacionada con un alto índice de endogamia, conociendo con el hecho que la mora de cultivo se reproduce principalmente por estacas. Estos resultados sugieren una pérdida de variabilidad genética en la especie *R. glaucus* que puede ser explicada por la explotación intensiva de monocultivos. Por el contrario se observó una elevada variabilidad genética en todas las especies silvestres del género *Rubus*, con un posible flujo genético, entre especies.

ABSTRACT

The genus *Rubus* groups species belonging to rosacea that include blackberries and raspberries. The cultivation of blackberry has focused on the blackberry, which has been printed in the years in its area of cultivation in one of the most important fruit trees for the national economy. However, there is no specific report on the subject. The main research on gender has focused on physicochemical studies of the fruit, agricultural management and, to a lesser extent, molecular characterization. Molecular characterization studies allow better management of genetic resources, basic knowledge about genetic relationships, processes of loss of diversity, gene flow between species. This knowledge, in turn, allows future conservation and improvement programs, the reason why this work seeks to characterize the genetic diversity of the Andean highlands of Ecuador, using microsatellite molecular agents. It is characterized by a total of 135 accessions of blackberries, cultivated and wild. In a first phase, PCR conditions are standardized for 20 microsatellite markers reported for various species of the *Rubus glaucus*. In a second phase, the polymorphism of these 20 microsatellites will be analyzed, where a high average polymorphic index (0.624) was obtained, identifying a total of 180 alleles, and an observed average heterozygosity of 0.434, represented in turn by wild species of the genus *Rubus*. Through the analysis of the allocation made in the *R. glaucus* species, which was grouped in a differentiated way in the comparison with the rest of the analyzed ones, the conformation of the genetic groups was identified. However, these are closely related, and in the analysis of variability, it shows, has, has a greater tendency to homozygous and is closely related, has to do with a high rate of inbreeding, it is known the fact that the blackberry is mainly reproduced by stakes. These results have a loss of genetic variability in the *R.glaucus* species that can be explained by the intensive exploitation of monocultures. On the contrary, a high genetic variation can be observed in all wild species of the genus *Rubus*, with a possible genetic flow, between species.

INDICE

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	4
1.3. Justificación.....	5
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos específicos	6
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Origen y distribución.....	6
2.2. Descripción del género <i>Rubus</i>	7
2.2.1. <i>Rubus glaucus</i>	8
2.2.1.1. Importancia económica	9
2.2.1.2. Descripción botánica.....	10
2.2.1.3. Diversidad genética.....	10
2.2.1.4. Compuestos bioactivos	11
2.2.1.5. Domesticación	13
2.3. Caracterización molecular	13
2.3.1. Microsatélites o repetición de secuencia simple (SSR).....	15
2.3.2. Análisis de diversidad genética.....	16
3. CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Obtención del material vegetal.....	17
3.1.1. Material silvestre.....	17

3.1.2. Material de banco de ADN.....	17
3.2. Caracterización molecular	18
3.2.1. Extracción de ADN	18
3.2.2. Cuantificación	19
3.2.3. Validación de ADN purificado	19
3.2.4. Screening de microsatélites	20
3.2.5. Amplificación de microsatélites con la tecnología M13 tailing	23
3.2.5.1. Corrida electroforética en LI-COR 4300	26
3.2.6. Genotipado de marcadores SSRs	27
3.2.6.1. Análisis estadístico	27
3.2.6.2. Análisis de agrupamiento	27
3.2.6.3. Métodos multivariados	27
3.2.6.4. Análisis de Asignación Poblacional	27
3.2.6.5. AMOVA (Análisis Molecular de Varianza)	28
3.2.6.6. Identificación de genotipos duplicados	28
4.1. Validación de ADN	28
4.2. <i>Screening</i> de marcadores SSRs.....	30
4.2.1. Pruebas de marcadores con M13-tailing.....	33
4.3. Análisis de diversidad	36
4.3.2. Análisis de estructura en el grupo G1	48
4.3.3. Análisis molecular de varianza	50
5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES.....	53
5.1. Conclusiones	53
5.2. Recomendaciones	54
REFERENCIAS.....	55

ANEXOS.....	63
-------------	----

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Ecuador tiene una elevada producción de frutales destinados a consumo interno y a la exportación. Entre las más comunes se encuentran las diferentes especies y variedades del género *Rubus* distribuidas entre 2200 y 4000 m.s.n.m. como *R. floribundus* (mora silvestre), *R. glabratus* (mora de la virgen), *R. adenotrichus* (mora silvestre), *R. roseus* (mora silvestre), *R. azuayensis* y *R. glaucus* conocida como mora de Castilla (Jacome, 2016; Romoleroux, 1996).

En las áreas con cultivos de especies de *Rubus*, se han reportado plantas silvestres que se encuentran en crecimiento secundario en los márgenes del cultivo, en páramos y carreteras. Las plantas cultivadas y silvestres tienen el potencial de interactuar entre sí; al ser los cultivares más extensos, estos tienden a influir en la diversidad genética de las poblaciones naturales a través de la pérdida de genes y transferencia de polen (Marulanda, López, & Aguilar, 2007).

El género *Rubus* comprende más de 700 especies identificadas y distribuidas en 12 géneros, que presentan una gran diversidad fenotípica e incluye especies de producción y silvestres, por ejemplo, frambuesas y moras. Una de las especies más cultivadas en el Ecuador es la mora de castilla (*Rubus glaucus*). Este cultivo reporta rendimientos de 5 toneladas por hectárea al año, con una superficie total cultivada de aproximadamente 5000 hectáreas (Jacome, 2016; Romoleroux, 1996).

La producción de estos frutales ha tomado fuerza en la actualidad, debido a sus propiedades antioxidantes y a la alta concentración de compuestos polifenólicos, antocianidinas y flavonoides (Moreno & Oyola, 2016; Valentinuzzi, 2018). El INEC, (2000) en el tercer censo nacional agropecuario, reportó que el cultivo de mora de Castilla, comprende aproximadamente 4046 ha en monocultivo, distribuidas en 10909 UPAs (unidad de producción agropecuaria), con un total de producción de 10283 t por año censal y 1201 ha en cultivo

asociado. Igualmente, se reportaron pérdidas de 143 ha en monocultivo, de las cuales 55 ha se perdieron por heladas y 62 ha por motivos desconocidos. También se reportaron 267 ha pérdidas en cultivo asociado, de las cuales 183 ha se perdieron por heladas y 62 ha por razones no especificadas.

El cultivo de mora tiene una elevada demanda que incrementa anualmente en un 12%, siendo de gran importancia socioeconómica debido a su capacidad productiva en áreas reducidas. Al año se cultivan 14546 unidades productivas agrícolas en aproximadamente 5247 ha. permitiendo el sustento económico y permanente de más de 12000 productores, siendo comercializado en el mercado nacional para su consumo fresco e industrializado, y en el internacional como pulpa y extracto (Galarza, Garcés, Velásquez, Sánchez, & Zambrano, 2016; Sánchez, Villares, Niño, & Maria, 2018).

La implementación de buenas prácticas de cultivo y el estudio de germoplasmas silvestres ha despertado el interés científico. Los cultivares de mora, en otros países, son los más estudiados, tanto a nivel de características organolépticas, como genética, debido a que los procesos de cultivo y la interacción con especies del género *Rubus* afectan a la calidad final del producto (Clark & Finn, 2011; Miyashita, Kunitake, Yotsukura, & Hoshino, 2015).

Las investigaciones más relevantes sobre este género involucran caracteres morfológicos y nutricionales, que determinan por ejemplo, el tamaño del fruto, las propiedades fisicoquímicas, la presencia o ausencia de espinos, entre otras (Moreno & Oyola, 2016; Sánchez, 2018).

Los estudios basados en técnicas moleculares permiten una caracterización genética fiable para determinar la diversidad genética de la especie. En varios estudios de este tipo se han utilizado marcadores moleculares, entre ellos podemos mencionar a los RAPD, los AFLP, ITS y microsatélites-SSR (Lee, 2015; Marulanda, López, & Uribe, 2012).

En estudios desarrollados en Corea y Estados Unidos utilizando RAPDs, ITS y

AFLPs se ha logrado la identificación de especies diploides, tetraploides, de ploidía impar y aneuploidía en cultivos de las especies *R. glaucus*, *R. coreanus*, *R. watson* respectivamente (Clark & Finn, 2011; Lee, 2015; Miyashita, 2015). En investigaciones realizadas en Colombia con marcadores de tipo AFLPs, RAPDs y SSRs en diferentes muestras de la especie *R. glaucus*, se determinó que este gran grupo se divide en dos subgrupos, el primero con una similitud cercana al 100% y el otro subgrupo con una similitud del 98%. Cabe recalcar que en este estudio resaltan ciertos ejemplares silvestres con una menor similitud que los consideran de gran interés. En estos estudios se pudo diferenciar claramente las especies silvestres de las cultivadas, además de las variedades sin espinas y con espinas, siendo todas independientes del lugar de muestreo (Marulanda, 2007, 2012).

En el Ecuador, investigaciones realizadas con AFLPs y RAPDs se ha determinado un nivel moderado de variabilidad genética en muestras de *R. glaucus* cultivadas, distinguiéndose dos grupos genéticos de cultivares (Datos no mostrados).

El estudio más reciente en el Ecuador sobre la variabilidad genética de *Rubus spp.* con marcadores de tipo SSR, se realizó con 8 marcadores descritos por Marulanda, (2012), en 5 genotipos más dos controles de la familia *Rosaceae* como son la rosa y frutilla. En este estudio se diferenció a los controles de *Rubus nubigenus*, *Rubus laciniatus*, *Rubus glaucus*, *Rubus niveus* y *Rubus adenotrichos* (Datos no mostrados).

Con base en los estudios de diversidad mencionados anteriormente se han desarrollado investigaciones que han permitido establecer variedades con características conservadas, como la resistencia al pulgón (*Amphorophora agatonica*) encontrada en *Rubus occidentalis* (Bushakra, 2015). Martínez, Vásquez, Viteri, Jácome, & Ayala, (2013) en el Ecuador realizaron cruces hasta obtener la variedad sin espinos y de alta producción como *Rubus glaucus Benth* conocida como Andimora, la cual es una de las más comercializadas por facilitar la recolecta del fruto. Al-Khayri, Jain, & Johnson, (2016) identificaron

características en dos especies de moras como son *R. kuntzeanus* y *R. cuthbert 1924*, con características como tallos delgados y mayor porosidad de hojas, que permiten una mayor resistencia a temperaturas elevadas que fluctúan alrededor de 36°C. A partir de este estudio se planteó un futuro cruce de estas especies, con el fin de fijar estas características.

Estos son algunos ejemplos claros que demuestran que al explorar la diversidad genética de la especie contribuye al desarrollo de nuevo conocimiento, con una perspectiva de mejorar la productividad, calidad y producción de la mora de castilla.

1.2. Planteamiento del problema

El cultivo de mora ha ido incrementando con los años, esto ha sido acompañado por una domesticación que mantienen a la especie *Rubus glaucus* como la preferida de los agricultores, dejando de lado a las especies silvestres. Como se menciona en los antecedentes de este trabajo, los estudios realizados sobre la variedad *R. glaucus* y otras de gran importancia se han centrado en la caracterización bioquímica, en la diferenciación de especies por características morfológicas; y en menor medida la caracterización molecular.

Los análisis moleculares en el Ecuador hasta el momento son insuficientes requiriéndose estudios adicionales con tecnologías de alto poder discriminante como los marcadores microsatélites, ahora disponibles para el género *Rubus*.

Los microsatélites disponibles hasta el momento se han desarrollado en base a especies diferentes de *Rubus glaucus*, por lo cual no se han probado marcadores específicos que permitan identificar claramente a esta especie o diferenciarla de otras.

Esto plantea una necesidad de implementar estudios genéticos con una perspectiva amplia, que involucren simultáneamente especies de producción y especies silvestres, para lograr una comparación significativa que permita determinar en primera instancia la diversidad genética, el alcance de las

interacciones y relaciones entre los cultivares y las especies silvestres.

1.3. Justificación

El análisis molecular de plantaciones comerciales como la mora son importantes debido a que los estudios realizados hasta el momento, no toman en cuenta la influencia de los monocultivos y el clonaje, lo que conlleva a mantener plantas genéticamente idénticas y disminuye la adaptabilidad y aptitud biológica. Estos factores deterioran la calidad de las plantas en general. En consecuencia, se expresa en plantas susceptibles a enfermedades y plagas (Clark & Finn, 2011; Ryu, 2018).

La identificación de la diversidad genética en líneas de producción y especies silvestres con marcadores moleculares como los microsatélites, facilitará el manejo y uso de los recursos genéticos, estableciendo relaciones genéticas, presencia de duplicados genotípicos y la variabilidad genética dentro del género. Esto contribuirá a un mejor manejo del cultivo de mora.

Con este trabajo se propone realizar la caracterización molecular con marcadores microsatélites de moras cultivadas y silvestres de zonas alto andinas del Ecuador. Los resultados permitirán definir estrategias para el uso y conservación de la diversidad de este cultivo; además constituirá la base para la implementación del mejoramiento de cultivos que tienen como objetivo aumentar la productividad, la producción, resistencia a climas adversos y enfermedades, estableciendo finalmente líneas promisorias para la generación de nuevas variedades de mora.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Caracterizar la diversidad genética de moras de zonas alto andinas del Ecuador utilizando marcadores moleculares microsatélites.

1.4.2. Objetivos específicos

- Validar la amplificación y polimorfismo de un set de 30 marcadores microsatélites (SSRs) reportados para el género *Rubus*.
- Determinar los marcadores SSR útiles para el genotipaje de mora con marcadores microsatélites y la tecnología M13-Tailing en el equipo en LI-COR 4300S.
- Complementar la caracterización molecular de la colección de mora del INIAP con materiales provenientes del sur del país (Azuay, Cañar y Loja).

2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

El género *Rubus* agrupa especies pertenecientes a la familia de las rosáceas, la cual incluye moras, zarzamoras y frambuesas. El nombre genérico deriva del latín zarza. Este género se agrupa en subgéneros, de los cuales los más representativos son el *Idaeobatus*, *Malachobatus* y *Fruticosus* (Alarcón, 2018; Galarza, 2016).

2.1. Origen y distribución

El género *Rubus* fue descrito por Linné & Salvius, (1753) este género tiene su origen de las regiones templadas y frías de Europa, Asia y América del Norte, sin embargo se han encontrado varias especies en estado silvestre en sur y centro América (Castillo, Reed, & Bassil, 2007; Espinosa, Ligarreto, Barrero, & Medina, 2016).

Se encuentra ampliamente distribuido en las zonas altas de Sudamérica y Centroamérica, especialmente en Ecuador, Colombia, Chile, Guatemala Panamá y México, además en ciertos países de Europa como es España, Holanda, Italia (Galarza, 2016).

2.2. Descripción del género *Rubus*

El género *Rubus* está conformado por aproximadamente 700 especies, agrupadas en 12 subgéneros de los cuales destacan por su calidad e importancia el subgénero *Idaeobatus* que agrupa frambuesas y *Eubatus* que incluye moras (Castillo, 2007).

En Ecuador se han reportado 21 especies que corresponden además de los subgéneros anteriormente mencionados, al subgénero *Orobautus*, el cual se difunde en toda Sudamérica. De las especies mencionadas la mayoría son de tipo silvestre como *Rubus floribundus*, *Rubus glabratus*, *Rubus adenotrichas* y *Rubus roseus*, y un tipo que es ampliamente comercializado como es *Rubus glauucus* o mora de castilla (Jacome, 2016; Moreno & Oyola, 2016).

Los parientes silvestres de frutas cultivadas son una rica fuente de variabilidad genética, que puede contribuir en gran manera a rasgos relacionados con el vigor, productividad, resistencia a plagas, enfermedades y climas adversos (Dotor, Gonzalés, Castro, Morillo, & Morillo, 2016).

Debido a los constantes cambios del bioma de las especies cultivadas, se ha optado por la investigación de especies silvestres en busca de genes útiles para fitomejoramiento, conservación y mantenimiento del germoplasma ya que este recurso es limitado por la rápida urbanización, industrialización, la agricultura de tala y quema (Alarcón, 2018; Dossett, Bassil, Lewers, & Finn, 2012; Vujović, Ruzic., 2017).



Figura 1. Planta de Rubus con todas las partes
Tomado de Prah, (sf)

2.2.1. *Rubus glaucus*

Rubus glaucus conocida comúnmente como mora de castilla es uno de los frutales con uno de los mayores potenciales agronómicos en el Ecuador. Está ampliamente distribuido en las provincias de Carchi, Bolívar y Tungurahua y se estima que esta última zona es la mayor productora con una superficie plantada de aproximadamente 3700 hectáreas, con un rendimiento de 5,45 toneladas por hectáreas al año (Sánchez, 2018).

La mora de castilla es considerada un híbrido de dos subgéneros *Idaeobatus* y *Fruticosus*. Dependiendo de su ubicación se la conoce también como zarzamora azul, mora blanca, mora y en inglés como *Andean blackberry* o *Andean raspberry* (Clark & Finn, 2011; Martínez, 2013).

En la especie se identifican dos subtipos: la mora con espinos y sin espinos, estos se encuentran distribuidos en el callejón interandino y estribaciones de la sierra, entre los 2000 y 3100 m de altura (Espinosa, 2016). En la tabla 1 se puede apreciar la clasificación botánica de mora de castilla.

Tabla 1.

Clasificación botánica de la especie más cultivada en el Ecuador

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Arquiclamídea
Orden	Rosales
Familia	Rosácea
Género	<i>Rubus</i>
Especie	<i>glaucus</i>
Nombre Científico	<i>Rubus glaucus</i>

Adaptado de (Romoleroux, 1996 & USDA, 2003)

2.2.1.1. Importancia económica

La mora es un fruto con gran aceptación en el mercado internacional como un producto no solo de consumo fresco sino procesado en concentrados, pulpas, néctar, dulces y jugos (Espinosa, 2016; Moreno & Oyola, 2016).

Para el año 2017 se produjeron a nivel mundial más de 2 millones de toneladas de zarzas, con un total aproximado de 280.000 hectáreas cultivadas (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016).

China, Turquía y Estados Unidos son los principales productores mundiales de zarzamoras, con una producción equivalente a 25,85%, 21,5% y 19,9% respectivamente (Food and Agriculture Organization of the United Nations

(FAO), 2016).

Chile, Colombia y Guatemala son los principales exportadores latinoamericanos, el mercado principal son los Estados Unidos al igual que Europa en la época invernal (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016; Jacome, 2016).

2.2.1.2. Descripción botánica

La mora de castilla se caracteriza por ser una planta de tipo perenne, de porte arbustivo, trepadora. Está formada de varios tallos redondeados y espinosos o no, con forma de corona en la base de la planta; las hojas son trifoliadas de bordes aserrados; su color depende de su estado vegetativo, inicialmente son de color rojizo y llegan a ser de color verde oscuro y de tono blanquecino en el envés; las raíces son filiformes, racimosas distribuidas entre los primeros 30 cm del suelo (Espinosa, 2016; Jacome, 2016; Martínez, 2013).

Las inflorescencias contienen de 15 a 22 flores ligeramente cubiertas por hojas, las flores son compuestas, actinomorfas y hermafroditas, de color blanco o rosado de pétalos ovalados los pistilos tienen un ovario y dos óvulos que dan origen a la drupa (Clark & Finn, 2011; Martínez, 2013).

El fruto es una baya elipsoidal constituido por aproximadamente 100 drupas adheridas al receptáculo floral, conteniendo cada drupa una semilla. Cada inflorescencia puede llegar a tener hasta 25 frutos, el proceso de maduración es disparejo y va tomando un color rojo oscuro a su término (Jacome, 2016).

Las características botánicas de la mora hacen que sea importante su estudio genético ya que la expresión de mejores características fenotípicas depende de la variabilidad genética que esta contenga.

2.2.1.3. Diversidad genética

Se ha demostrado que el género *Rubus* presenta altos índices de apomixis, duplicación genómica y no reducción de gametos durante la meiosis. El número

básico de cromosomas es de $x=7$, estos aspectos no son comunes para todas las especies que lo conforman, ya que la ploidía va desde $2n=2x=14$ a $2n=14x=98$ (Rodríguez Bautista, 2018; Vujović, Ružić,, 2017). Las especies de *Rubus* presentan genotipos poliploides, alopoliploides o autopoliploides (Clark & Finn, 2011).

Rubus glaucus es considerada una especie tetraploide, que presenta 28 cromosomas ($2n=4x$), de pequeño tamaño (1,5 a 2 μm) (Galarza, 2016).

La segregación cromosómica es determinada por la ploidía, debido a que cada cromosoma presenta varios homólogos. Esto a su vez hace que los híbridos interespecíficos fértiles generan múltiples combinaciones de alelos en cada locus (Acuña-Rodríguez, Gouin, Cifuentes-Lisboa, & Squeo, 2018; Rodríguez Bautista, 2018; Rodríguez, 2016).

El nivel de ploidía permite predecir combinaciones parentales, entrecruzamiento, conocer la filogenia, evolución y distinguir características entre las especies (Acuña-Rodríguez, 2018; Hernández-Bautista, 2018). En programas de fitomejoramiento, la ploidía es importante para la selección de germoplasma parental, ya que la distancia genética es un factor vinculado a la heterosis y rendimiento de los cruces. Por esta razón es importante mantener una amplia diversidad genética (Castillo, 2007; Hernández-Bautista, 2018).

2.2.1.4. Compuestos bioactivos

Varios estudios han demostrado que la mora es una fuente importante de antioxidantes, con una alta concentración de compuestos polifenólicos como antocianinas, flavonoides, catequinas, ácido ascórbico y derivados de ácido elágico. Estos son reconocidos como retardantes de la oxidación de tejidos causantes del envejecimiento (Campbell, McKenzie, Murray, Delgoda, & Bowen-Forbes, 2017; Espinosa, 2016; Moreno & Oyola, 2016; Valentinuzzi, 2018).

En el estudio realizado en mora por Alarcón, (2018) mostraron la composición nutricional y el efecto protector al daño oxidativo. La composición nutricional presentó valores significativamente elevados de carotenoides, vitamina C; y en menor cantidad se presentaron flavonoides, antocianinas, luteína. El extracto de la mora se probó sobre fibroblastos dérmicos humanos, comprobando que se atenuó el daño oxidativo en las células, demostrando que son una fuente relevante de compuestos bioactivos prometedores para la salud humana.

En el estudio realizado por Campbell, (2017) determinaron la capacidad antioxidante y específicamente las propiedades inhibitorias contra las enzimas CYP, que están involucradas en la oxidación de compuestos lipófilos como ácidos grasos, esteroides y vitaminas. Además juega un papel importante en la activación oxidativa de procarcinógenos. Se comprobó la presencia de compuestos fenólicos, predominando el ácido elágico. Además, se demostró que el ácido euscáfico tiene una elevada capacidad antioxidante seguido por el ácido pomólico, quercetina y kaempferol. Seguido se identificó la presencia de la cianidina 3-O-glucósido como un inhibidor moderado no competitivo del complejo enzimático. Al final del estudio demostraron la existencia de compuestos antioxidantes importantes en *Rubus rosifolius* con una perspectiva quimioterapéutica.

En el estudio realizado por Szymanowska, Baraniak, & Bogucka-Kocka, (2018) con extractos de *Rubus idaeus L.*, se determinó la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de estos extractos, inhibiendo la lipooxigenasa, ciclooxigenasa-2, con resultados favorables. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de interacción así como la existencia de antagonismos o sinergismo.

Estos estudios variados han identificado una gran cantidad de compuestos en distintas especies de *Rubus*, incluyendo *R. glaucus*, recalando su importancia en cuanto a los compuestos bioactivos. Sin embargo, no se conoce en su mayoría el mecanismo de acción y cuál es la composición exacta de los extractos, necesitando estudios más amplios.

2.2.1.5. Domesticación

La domesticación de la mora proviene de la selección de dos a tres variedades para la cría y mejora. Con muy pocos clones de los mismos, se obtuvieron la mayoría de los cultivares mejorados actualmente. El desarrollo de un cultivo de *Rubus* mantiene una preferencia por especies adaptadas a ambientes controlados que involucran temperatura, viento y nutrición óptima para obtener plantas de ciclo corto y alto rendimiento (Dossett, 2012). Además, la nutrición juega un papel importante en los cultivares en cuanto a la expresión fenotípica de las características, ya que estos puede presentar una amplia variabilidad debido a las condiciones del bioma, pero genótipicamente pueden ser iguales (Valentinuzzi, 2018), por lo que, realizar cruces entre plantas de cultivares diferentes puede resultar en un genotipo conservado.

La minimización de uniformidad genética y la búsqueda de mayor diversidad es muy ventajosa para la supervivencia continua del cultivo de la mora (Castillo, 2007; Clark & Finn, 2011), sin embargo, la base genética estrecha de los cultivos prevé graves consecuencias a futuro ya que las plantas están en continua amenaza por el estrés ambiental, pese a tener un valor elevado comercial, este es inversamente proporcional para la conservación de la base genética (Castillo, 2007; Dossett, 2012).

2.3. Caracterización molecular

En los últimos años, se ha evidenciado que la caracterización morfológica de los frutales presenta varios limitantes, debido a que la expresión fenotípica depende de la genética y los factores ambientales. Esta caracterización sólo es posible evaluarla por completo, cuando la planta llega a la madurez y necesita de descriptores específicos como el color, forma y hábito de crecimiento, que ayuden a su clasificación (Franco & Hidalgo, 2003; IPGRI, 2007).

Es por ello que, en los últimos años, la caracterización molecular del germoplasma se ha convertido en una herramienta muy importante que permite la clasificación de los cultivares, así como su relación genética, determinación

de la diversidad, estudios evolutivos, identificación, protección y manejo del germoplasma (Amsellem, Dutech, & Billotte, 2001; Clark & Finn, 2011). Para este fin, se utilizan marcadores moleculares como enzimas y fragmentos de ADN, que permiten evidenciar variaciones o polimorfismos en secuencias de ADN o ARN, entre dos o más individuos, ya sea que el gen codifique o no para un fenotipo determinado (Ferreira & Grattapaglia, 2000).

Un marcador molecular por excelencia debe ser polimórfico, ampliamente distribuido en el genoma y codominante. Además, su detección debe ser rápida y de bajo costo (Clark & Finn, 2011; Ferreira & Grattapaglia, 2000; Morillo & Miño, 2011).

Los marcadores moleculares basados en ADN se apoyan en la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y existen varios tipos como amplificadores universales, “multilocus” y de sitio específico. Los universales se basan en secuencias conocidas en común para las especies; los “multilocus” no requieren información de la secuencia del genoma a amplificar; y los de sitio específico requieren el conocimiento de la secuencia de las zonas flanqueadas para obtener los cebadores (Velasco, 2014). Los principales marcadores moleculares que se aplican en estudios de variabilidad genética se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

Marcadores moleculares basados en la hibridación y la amplificación en PCR.

Marcador Molecular	Abundancia de Polimorfismos	Dominancia	Reproducibilidad	Automatización	Costo de funcionamiento	PCR
RFLP	Bajo	Codominante	Alta	Baja	Alta	No
RAPD	Medio	Dominante	Baja	Media	Baja	Si
CAPS	Alta	Codominante	Alta	Media	Media	Si
AFLP	Alto	Dominante	Alta	Media/alta	Media	Si
SSR	Alto	Codominante	Alta	Media/alta	Baja	Si
ISSR	Alto	Dominante	Alta	Media/alta	Baja	Si
SRAP	Medio	Codominante	Alta	Media	Baja	Si
SNP	Alto	Dominante/ Codominante	Alta	Media/alta	Baja	Si
TRAPs	Medio	Dominante	Alta	alta	Baja	Si

Adaptado de (Castillo, 2007; Ferreira & Grattapaglia, 2000; Lai, Lorenc, &

Edwards, 2015; Velasco, 2014).

Nota: Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), secuencias polimórficas amplificadas escindidas (CAPS), polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado (AFLP), repetición de secuencia simple (SSR), repetición de inter secuencias simple (ISSR), Marcadores de polimorfismo amplificado relacionado con la secuencia (SRAP), expresión de secuencia Tags (SRAP), polimorfismo de nucleótido único (SNP), Polimorfismo de amplificación de la región objetivo (TRAPs)

2.3.1. Microsatélites o repetición de secuencia simple (SSR)

Los SSR son marcadores moleculares conocidos por ser secuencias cortas de uno a cinco nucleótidos, repetidos en tándem. Este tipo de repetición se la conoce como *motifs*. Su polimorfismo está basado en la repetición de los *motifs* que originan una variación en la longitud de las secuencias (Lai, 2015; Morillo & Miño, 2011).

Durante el proceso de PCR, las enzimas de replicación del ADN tienen una dificultad al copiar las regiones del genoma que poseen estas secuencias repetidas, lo que provoca un cambio de longitud a través de cada ciclo de amplificación. Estas secuencias están presentes en al menos 10^5 copias por genoma y contribuyen hasta en un 10% del ADN total (Ferreira & Grattapaglia, 2000; Karp, 2009; Velasco, 2014).

Los SSR pueden encontrarse en secuencias codificantes y no codificantes, de las cuales se espera una variación en la frecuencia, tipo de repetición, unidades repetidas y el número de repeticiones (Karp, 2009; Lai, 2015; Velasco, 2014).

Dentro de los tipos de tecnologías para la caracterización molecular con microsatélites se encuentra la tecnología M13. Esta tecnología se basa en añadir una cola M13 con 19 pb al extremo 5' (5'-CACGACGTTGTAAAAC-GAC-3') de cualquier cebador; la cola M13 es complementaria con un marcador universal fluorescente añadido al mix de PCR generando un alelo amplificado marcado. Este es detectado por un analizador de genes automático, con un sistema de reconocimiento láser durante la electroforesis de los fragmentos

marcados (Culley, 2013; Neilan, Wilton, & Jacobs, 1997).

Este tipo de tecnología ha sido ampliamente usada en otros marcadores como los AFLPs y SSRs, debido a la alta disponibilidad de cebadores para una amplia variedad de organismos y su fácil síntesis, a pesar que requiere un análisis adicional de los alelos amplificados, es importante recalcar que la capacidad de multiplexación de los loci marcados es evidente puesto que los alelos migran a rangos de tamaño que no pueden superponerse (Culley, 2013; Deschepper, 2001)

2.3.2. Análisis de diversidad genética

Las herramientas bioinformáticas, mediante programas estadísticos permiten la organización y análisis de los datos depurados, en base a los *motifs* de cada microsatélite, obteniendo una matriz de datos que permite determinar el número de observaciones, que se define como el número de alelos presentes para una muestra; la frecuencia alélica se obtiene al dividir el número de veces que se presenta un alelo para el número total de alelos dentro de un gen; el número de alelos efectivos que es la cantidad real de alelos presentados para cada locus; el contenido de información polimórfica (PIC) es un índice que depende de la cantidad y frecuencia de alelos para un marcador; la heterocigosis observada (H_o) y la esperada (H_e); la estructura de genética de una población es el resultado de la interacción de factores de selección, mutación y migración que pueden aumentar o reducir los niveles de variabilidad, esta estructura se puede representar gráficamente mediante árboles genéticos; adicionalmente a los descritos existen otros métodos denominados multivariados los cuales permiten encontrar la asociación propicia de un individuo a un clúster o población, basándose en matrices de distancia e interacciones. De esta manera se determina poblaciones genéticas distintas. El análisis supone que dentro de las poblaciones, los loci están en equilibrio de vinculación y de Hardy-Weinberg. esto permite asumir un modelo de k poblaciones, las cuales se caracterizan por tener un conjunto de frecuencias alélicas para cada locus, asignando de manera probabilística los individuos a

las poblaciones (Evanno, Regnaut, & Goudet, 2005; Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000), dentro de estos métodos se encuentra el análisis de coordenadas principales (PcoA), el cual representa gráficamente en planos euclidianos a las muestras con distancias más conservadas; El análisis molecular de varianza (AMOVA) permite determinar la variabilidad entre y dentro de las poblaciones y el grado de confianza de estos resultados (Capel & Yuste, 2016; Park, 2000; Villardón, 2015).

3. CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del material vegetal

3.1.1. Material silvestre

La recolección del material la realizó el personal del programa de Fruticultura de la Estación Experimental del Austro del INIAP.

La prospección se realizó, en Azuay en las localidades Guabisay, Payacorral, Curin Alto, Chanin, Pucashapa, Pucara, Guno, La Paz y Jima; en Cañar en las localidades de Chorocopte y Cungapite; y en Loja en las localidades de Saraguro lagunas alto, Carboncillo y Jimbura.

Se recolectaron los primordios foliares y hojas tiernas de 57 tipos de moras obteniendo 100 mg de muestra fresca de cada tipo de mora, el cual fue colocado en una bolsa hermética con 50 gr de sílica gel. Las muestras foliares secas se traspasaron a bolsas de papel y fueron almacenadas en un desecador conforme a lo indicado en (Morillo & Miño, 2011).

Las muestras fueron codificadas con las iniciales “ss” en numeración ascendente, de acuerdo al orden de colecta. En el Anexo 1 se describen los datos de colecta.

3.1.2. Material de banco de ADN

Se completó el material de estudio con 78 muestras de ADN disponibles del banco de ADN del Departamento de Biotecnología del INIAP-EESC. La

codificación de las muestras y sus especificaciones se describen en el Anexo 2.

3.2. Caracterización molecular

La parte experimental se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología, localizado en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP. Se analizó un total de 136 muestras las cuales fueron manejadas con la metodología descrita a continuación.

3.2.1. Extracción de ADN

La extracción se llevó a cabo con el protocolo de Khanuja, S., (1999) y modificaciones reportadas en (Morillo & Miño, 2011): se transfirió el tejido vegetal recolectado (50 mg) a un microtubo de 1.5 mL y se trituró con perlas de aluminio durante 5 min a 26 1/s, en un molino de bolas Retsch® MM400. A la muestra molida se le añadieron 750 µL de buffer de extracción (100 mM Tris HCL pH 8.0; 1.5 M NaCl; 25 mM EDTA pH 8.0; CTAB 2.5%; PVP 1%; 2®-mercaptoetanol 0.2%). Se homogeneizó la mezcla y se incubaron en baño maría a 60°C por 2 horas, con agitación cada 20 minutos. Al final del proceso de lisis, se añadieron 750 µL de CIA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), se mantuvo una mezcla homogénea por inversión del tubo y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante se traspasó a un nuevo microtubo de 1.5 mL y se añadieron 500 µL isopropanol conservado en frío, se mezcló por inversión del tubo y se incubó a -20°C por 1 hora.

Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado 2 veces con 1 mL de etanol frío al 70% y 1 vez con 1 mL de etanol absoluto frío. Se secó el *pellet* durante 20 minutos a 40°C, el resultante se resuspendió en 100 µL de buffer TE (Tris HCL 10 mM, EDTA 1mM). Finalmente, se realizó un tratamiento de RNAsa (10 ng/µL), en una micro estufa a 37°C por 30 minutos. El ADN fue almacenado a -20°C.

3.2.2. Cuantificación

Se cuantificó el ADN de las muestras mediante espectrofotometría en el equipo EPOCH™ de Biotek®, empleando el programa GEN5 (BioTeK Instruments, 2011). Con la concentración determinada se realizaron diluciones con agua ultrapura hasta una concentración final de 10 ng/μl.

3.2.3. Validación de ADN purificado

La validación del ADN consistió en la verificación del producto de amplificación de cada una de las muestras de ADN. Para este propósito se empleó el microsatélite GB-RC-077 (tabla 5). Para la amplificación se utilizó el kit *Colorless Go Taq G2 Flexi* (Promega, USA), la reacción se describe en la Tabla 3 y se llevó a cabo en un termociclador, con un programa térmico detallado en la Tabla 4.

Tabla 3.

Mix de PCR de amplificación de ADN

Reactivos PCR	Concentración inicial	Concentración final	VOL. 1 rx (μL)
Agua ultra pura	-	-	2,18
GoTaq® flexi Buffer (x)	5	1	1,5
MgCl ₂ (mM)	25	2	0,60
dNTPs (mM)	5	0,25	0,38
Primer F (μm)	10	0,50	0,38
Primer R (μm)	10	0,50	0,38
GoTaq® G2 flexi DNA Polymerase (U/μl)	5	0,07	0,1
Muestra (ng/μl)	5	1,3	2
Volumen total (ul)			7,5

Tomado de (Morillo & Miño, 2011)

Tabla 4.

Programa térmico PCR

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Repetición
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	30
Anillamiento	53	45 s	
Elongación	72	1 min	
Elongación final	72	7 min	1
Enfriamiento	10	10 min	1

Tomado de (Morillo & Miño, 2011)

Los resultados de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% v/v teñido con *SYBR® Safe DNA Gel stain 10000 x (Invitrogen, USA)* utilizando el buffer TAE 1X, la corrida electroforética se realizó a 100 V por 35 minutos (Morillo & Miño, 2011).

3.2.4. Screening de microsatélites

Se verificó la amplificación de los microsatélites descritos en la Tabla 5, se empleó el mix PCR descrito en la Tabla 3. Se tomó en cuenta una temperatura de hibridación estándar para el programa de amplificación descrito en la Tabla 4 de 53°C.

Tabla 5.

Microsatélites evaluados

Ítem	Locus	Código GenBank	Secuencia	Tamaño (bp)
1	RhM018 ^{1.1}	FJ194447	F-ACCACCAATTGTACACCCAACAAC	309-418

			R-GATTGTGAGCTGGTGTACCAA	
2	RhM036 ^{1.1}	FJ194455	F-ACAGCAACCACCACCTCAACTAAT	202-339
			R-CTAGCAGAATCACCTGAGGCTT	
3	RhM023 ^{1.1}	FJ194449	F-ACCGACAACGACAATTCTCACATT	108-195
			R-GTTATCAAGCGATCCTGCAGTT	
4	RhM011 ^{1.1}	FJ194446	F-ACAAAGACAAGGCGTCCACAAC	270-321
			R-GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	
5	RhM001 ^{1.1}	FJ194444	F-ACGGTTCGGATAGTTAATCCTCCC	214-245
			R-CCAAGTGTGTAATGCAGGAA	
6	RhM021 ^{1.1}	FJ194448	F-ACCAGTCCCTTATAGGATCCAACG	278-294
			R-GAACTCCACCATCTCCTCGTAG	
7	RhM003 ^{1.1}	FJ194445	F-ACCCATCTCCAATTCAGTTCTTCC	176-216
			R-AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC	
8	RiM017 ^{1.1}	FJ194453	F-ACGAAACAGGTGGAAAGAAACCTG	183-197
			R-CATTGTGCTTATGATGGTTTCG	
9	RiM015 ^{1.1}	FJ194452	F-ACCGACACCGATCAGAGCTAATTC	348-360
			R-ATAGTTGCATTGGCAGGCTTAT	
10	76b ^{1.2}	NA	F-ACCTCACCCGAAATGTTCAACC	190-210
			R-GGCTAGGCCGAATGACTACA	
11	16a ^{1.2}	NA	F-ACTGTTGTACGTGTTGGGCTTT	145-169
			R-GGGTGTGGCCAGTTTCAGT	
12	116a ^{1.2}	NA	F-ACCCAACCCAAAAACCTTCAAC	180-299
			R-GTTGTGGCATGGCCTTTTAT	
13	105b ^{1.2}	NA	F-ACGAAAATGCAAGGCGAATTGT	165-173
			R-TCCATCACCAACACCACCTA	
14	137a ^{1.2}	NA	F-ACTGTGAGCAGAGTGAAGGAGCTA	198
			R-AGCATTATTCGCGCAGTTTT	
15	259-F ^{1.2}	NA	F-ACTGGCACAAGAAGCCTGTAAC	265
			R-TCCCATATCCCTCAGCATTTC	
16	263-F ^{1.2}	NA	F-ACATTCCGCCCTGCATAAATC	254
			R-GGAAATTGGAAACCATTGGA	

17	98d ^{1,2}	NA	F-ACGGCTTCTCAATTTGCTGTGTC	198
			R-TGATTTGAAATCGTGCGGTTA	
18	mRaCIRRI1 G3 ^{1,3}	AF205116	F-ACCTCTACAAAAGGATCTGCATGA	195-265
			R-CAGCAAAAAGTGAAATGGTTCA	
19	mRaCIRRIV 2A8 ^{1,3}	AF261693	F-ACTAAAAAGGCGCAACAGTCG	191-237
			R-AGACACAGAAACAGGCATCG	
20	mRaCIRRIH 3 ^{1,3}	AF205117	F-ACCTGGATGTGTGGGTGTGTATC	160-220
			R-CCTGGATATGTTTACCCTGACC	
21	GB-RC-020 ²	JX976551	F-ACAAGCAATAATGGGTGGATCA	303-318
			R-AATGGGAAGGCTGCAACT	
22	GB-RC-049 ²	JX976552	F-ACACAAGGTTGGTGAATGCG	196-210
			R-ATTGCACTCTTCCGCTCA	
23	GB-RC-062 ²	JX976553	F-ACACGACCCTTTGAATCGCT	157-175
			R-GCGAGGCAAGTATTGGTG	
24	GB-RC-067 ²	JX976554	F-ACAGAAGGTGTGCGAGACCC	287-297
			R-AACCGTGTACCGTGAAG	
25	GB-RC-074 ²	JX976555	F-ACAGAGTGGCCCTAGCCTTG	210-226
			R-ACCCGATGAAGCTGGTTT	
26	GB-RC-077 ²	JX976557	F-ACAGCACCCCTCTAAACCCGA	194-208
			R-TGCTCATATATAATCGATGTGCTT	
27	GB-RC-078 ²	JX976558	F-ACAGCAGCATCATCAGTTCCA	192-224
			R-TGCTTGGTGACCTCTGCT	
28	GB-RC-091 ²	JX976559	F-ATCCCGAAAACCACCATT	235-259
			R-CCTCTCTCTCCCCGTGAA	
29	GB-RC-098 ²	JX976560	F-ATGCCTCGATTGCAGAGA	201-216
			R-GAACTCACAGCAGGTCGC	
30	GB-RC-100 ²	JX976561	F-ATGTGCAGCAGCAGTGAA	210-286
			R-CTGGGTCCATCCACATTG	

Nota. ¹Fueron evaluados en un estudio realizado en *Rubus glaucus* por (Marulanda, 2012), ^{1,1}derivada de *Rubus idaeus* y "Marion" (Castillo, 2007), ^{1,2} derivada de *Rubus idaeus* (Graham, 2004), ^{1,3} derivada de *Rubus alceifolius* (Amsellem, 2001). ² precedentes de *Rubus coreanus* (Lee, 2015).

Para los microsatélites que no validaron, se realizaron modificaciones de la concentración de MgCl₂ (1,5 μM y 2 μM) en el cóctel de amplificación, y un gradiente de temperatura (50°C a 60°C) en el programa térmico (Velasco, 2014). Los cebadores que no presentaron producto de amplificación pese a las

modificaciones, fueron descartados del estudio.

3.2.5. Amplificación de microsatélites con la tecnología M13 tailing

Para la amplificación con la metodología M13 *tailing*, los microsatélites seleccionados del procedimiento anterior, se diseñaron cebadores con la cola M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') en el extremo 5' del *forward*. Se seleccionaron 20 microsatélites (Tabla 6) para las pruebas de M13 *tailing* en el LI-COR 4300s.

Tabla 6.

Microsatélites seleccionados

#	Microsatélites	#	Microsatélites
1	GB-RC-078 ²	11	RhM023 ^{1.1}
2	GB-RC-100 ²	12	RhM011 ^{1.1}
3	105b ^{1.2}	13	RiM017 ^{1.1}
4	259-F ^{1.2}	14	RhM036 ^{1.1}
5	16a ^{1.2}	15	76b ^{1.2}
6	RhM003 ^{1.1}	16	mRaCIRRI1G3 ^{1.3}
7	RhM018 ^{1.1}	17	mRaCIRRIH3 ^{1.3}
8	RhM021 ^{1.1}	18	mRaCIRRIV2A8 ^{1.3}
9	RiM015 ^{1.1}	19	GB-RC-020 ²
10	116a ^{1.2}	20	GB-RC-077 ²

Se realizaron pruebas para el marcaje *IRDye 700* e *IRDye 800*, en monoplex y dúplex. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador con un programa térmico de PCR descrito en la Tabla 8.

En primera instancia se realizaron amplificaciones en monoplex con los cebadores seleccionados (Tabla 6), el cóctel de PCR utilizado se detalla a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7.

Cóctel de amplificación para SSR-M13 tailing monoplex.

Reactivos monoplex PCR	Concentración inicial	Concentración final	VOL. 1 rx (μL)
Agua ultra pura	-	-	0.32
GoTaq® flexi Buffer (x)	5	1,00	1
MgCl ₂ (mM)	25	2,5	0.50
dNTPs (mM)	5	0,2	0.20
M13 700/800	1	0,16	0.80
Primer F-M13 (μ m)	1	0,01	0.05
Primer R (μ m)	10	0,16	0.08
GoTaq® G2 flexi DNA Polymerase (Promega, USA) (U/ μ l)	5	0,05	0.05
Muestra (ng/ μ l)	5	2	2
Volumen total (μ l)			5

Tomado de (Morillo & Miño, 2011)

Tabla 8.

Programa térmico PCR

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Repetición
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	95	4	1
Desnaturalización	95	1	25
Anillamiento	53	2	
Elongación	72	2	
Elongación final	72	10	1
Enfriamiento	4	10	1

Tomado de (Morillo & Miño, 2011)

Posteriormente se realizaron ensayos de combinaciones en dúplex utilizando el cóctel de amplificación detallado en la Tabla 9. Para formar los dúplex se tomó en cuenta igual marcaje *IRDye* y una diferencia superior a 30 pb según lo indicado en (Morillo & Miño, 2011). Los cebadores que no pudieron combinarse se corrieron en monoplex ensayándose pruebas de variación de $MgCl_2$ (1,5 mM y 2 mM) para optimizar la PCR. Los dúplex validados y los cebadores analizados en monoplex se detallan en la Tabla 10.

Tabla 9.

Cóctel de amplificación para SSR-M13 tailing dúplex.

Reactivos dúplex PCR	Concentración inicial	Concentración final	VOL. 1 rx (μL)
Agua ultra pura	-	-	0,19
GoTaq® Flexi Buffer (x)	5	1	1,00
MgCl₂ (mM)	25	2,5	0,50
dNTPs (mM)	5	0,2	0,20
M13 700/800	1	0,16	0,80
Primer F-m13 (μm)	1	0,01	0,05
Primer R (μm)	10	0,16	0,08
Primer F-m13 (μm)	1	0,01	0,05
Primer R (μm)	10	0,16	0,08
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA) (U/μl)	5	0,05	0,05
muestra (ng/μl)	5	2	2,00
Volumen total (ul)			5

Tomado de (Morillo & Miño, 2011)

Tabla 10.

Combinaciones establecidas con los cebadores seleccionados

Combinación	Locus	Alelo (pb)	Marcaje M13 (nm)
Dúplex 1	GB-RC-078	178	700

	GB-RC-100	203	
Dúplex 2	105b ^{1.2}	158	700
	259-F ^{1.2}	244	
Dúplex 3	16a ^{1.2}	145	700
	RhM003 ^{1.1}	176	
Dúplex 4	RhM018 ^{1.1}	209	800
	RhM021 ^{1.1}	278	
Dúplex 5	RiM015 ^{1.1}	348	800
	116a ^{1.2}	185	
Monoplex 1	RhM023 ^{1.1}	108	700
Monoplex 2	RhM011 ^{1.1}	270	800
Monoplex 3	RiM017 ^{1.1}	183	800
Monoplex 4	RhM036 ^{1.1}	202	800
Monoplex 5	76b ^{1.2}	250	700
Monoplex 6	mRaCIRRI1G3 ^{1.3}	195	800
Monoplex 7	mRaCIRRIH3 ^{1.3}	180	800
Monoplex 8	mRaCIRRIV2A8 ^{1.3}	201	700
Monoplex 9	GB-RC-020 ²	293	800
Monoplex 11	GB-RC-077 ²	249	700

3.2.5.1. Corrida electroforética en LI-COR 4300

La corrida electroforética se realizó en un gel de poliacrilamida, para lo cual se empleó 20 mL *Gel Matrix KB Plus* (LI-COR, USA) al de 6.5%, 150 µL persulfato de amonio al 10 % y 15 µL de TEMED (NNNN-Tetramethylethylene-dianime) (SIGMA-ALDRICH, USA) al 99%, se mezcló y vertió en placas de vidrio y se dejó polimerizar el gel por una hora. A continuación, se colocó el gel en el LI-COR con buffer *TBE1x KB Plus LI-COR* (LI-COR, USA), se realizó una pre-corrida por 25 min a 1500 V. Los productos de PCR fueron diluidos con solución *Blue Stop Solution LI-COR* (LI-COR, USA) y se desnaturizó a 94°C por 3 minutos. La corrida electroforética fue programada por 2 horas a 1500 V,

conforme a lo detallado en LI-COR Biociencias., (2004). Se obtuvo una imagen digital la cual fue importada para su análisis.

3.2.6. Genotipado de marcadores SSRs

Se obtuvo una imagen digital del gel, la cual se importó al asistente de lectura SAGA GT-SSR MX-GT 2 (LI-COR, USA). De este programa, se obtuvo una matriz de datos genotípicos, obteniendo los tamaños de los alelos que presenta cada ADN en cada locus o marcador SSR analizado.

3.2.6.1. Análisis estadístico

Para los análisis de variabilidad genética se utilizó el programa *Power Marker* V3.25 (Liu & Muse, 2005) y se obtuvieron los siguientes parámetros estadísticos: número de frecuencias alélicas, número efectivo de alelos, heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), y contenido de información polimórfica (PIC) (Castillo, 2007; Fernández, Antanaviciute, Govan, & Sargent, 2011).

3.2.6.2. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento se realizó con el programa *DARWIN* 6.0.10 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006), obteniéndose un árbol *Neighbour Joining* (NJ) consenso con un análisis de *bootstrap* de 1000 repeticiones.

3.2.6.3. Métodos multivariados

Se realizó el análisis de Coordenadas Principales (PcoA) en el programa *NTSYS* ver.2.1 (Rohlf, 2009), se usó el coeficiente de similitud SM (por sus sigla en inglés *Simple Matching*), y las opciones “*DCENTER*” y “*EIGEN*” para desplegar el plot de las muestras analizadas en las 2 y 3 primeras coordenadas de varianza.

3.2.6.4. Análisis de Asignación Poblacional

La asignación de los genotipos a una determinada población que asume un

modelo en el que hay k poblaciones se realizó con el programa *Structure* ver. 2.3.4 (Pritchard, 2000). En el programa se utilizó la opción “*Admixture Model*”, con una duración del periodo de “*Burning*” 90000 y repeticiones *MCMC* de 100000, con un total de 10 simulaciones con valores para k entre 1 a 10. Se utilizó un programa en línea adicional, con el fin de determinar la población real denominado “*Structure Harvester*” que emplea un método probabilístico para determinar el máximo valor Δk (Evanno, 2005), y se tomaron los datos con la población real elegida.

3.2.6.5. AMOVA (Análisis Molecular de Varianza)

Se calculó la diferenciación genética de los grupos formados en la totalidad de las muestras analizadas, y de *R. glaucus*. Para esto se utilizó el programa *GenAlex* V6.5, se utilizó un intervalo de confianza de 95% y con un *bootstrap* de 10000 (Excoffier, L; Smouse, Pe; Quattro, 1992; Peakall & Smouse, 2012).

3.2.6.6. Identificación de genotipos duplicados

Finalmente se identificó la presencia de genotipos duplicados, utilizando el complemento de Microsoft Excel *Microsatellites Toolkit* (Park, 2000).

4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Validación de ADN

Los resultados de la cuantificación se presentan en el Anexo 3. Un ejemplo de la verificación del producto de amplificación para cada muestra, se indica en la Figura 2.

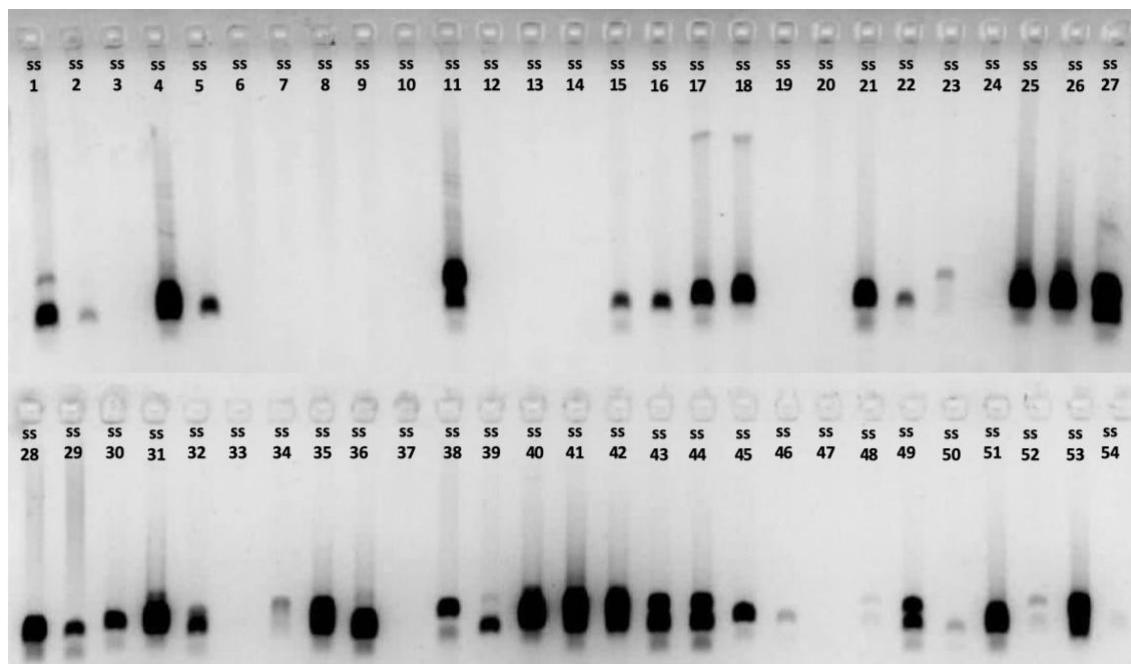


Figura 2. Verificación del producto de amplificación en las muestras silvestres

En los resultados observados en la figura 2, se determinó la ausencia del amplicón en las muestras ss3, ss6 a ss10, ss12, ss13, ss14, ss19 ss20, ss24, ss33, ss37, ss47, ss54. Para las muestras que no amplificaron el fragmento esperado, se repitió la extracción del ADN y cuantificación, junto a las muestras ss55 a ss57 que tampoco validaron. Al ser estas muestras de tipo silvestre, se realizó la segunda validación con los microsatélites GB-RC-077 y GB-RC-020, obteniendo un producto de amplificación final para todas las muestras. La muestras silvestres tienen una ploidía muy variable y puede estar o no presente para un marcador determinado, por lo que, las nuevas extracciones y validaciones de ADN con dos tipos de SSRs aseguraron la permanencia de las muestras para el análisis (Martinez & Beltrán, 2007; Rodríguez Bautista, 2018).

En la figura 3 se representan las muestras desde R1 a R58, con un control positivo ss35 y un negativo. Las muestras que no presentan producto de amplificación fueron descartadas. Se cuantificó un total de 90 muestras de ADN. Los resultados se presentan en el Anexo 4. Debido a la falta de disponibilidad del material biológico, las muestras que no presentaron producto de amplificación fueron descartadas, con un total de 78 muestras para análisis

que se describen en el Anexo 4.

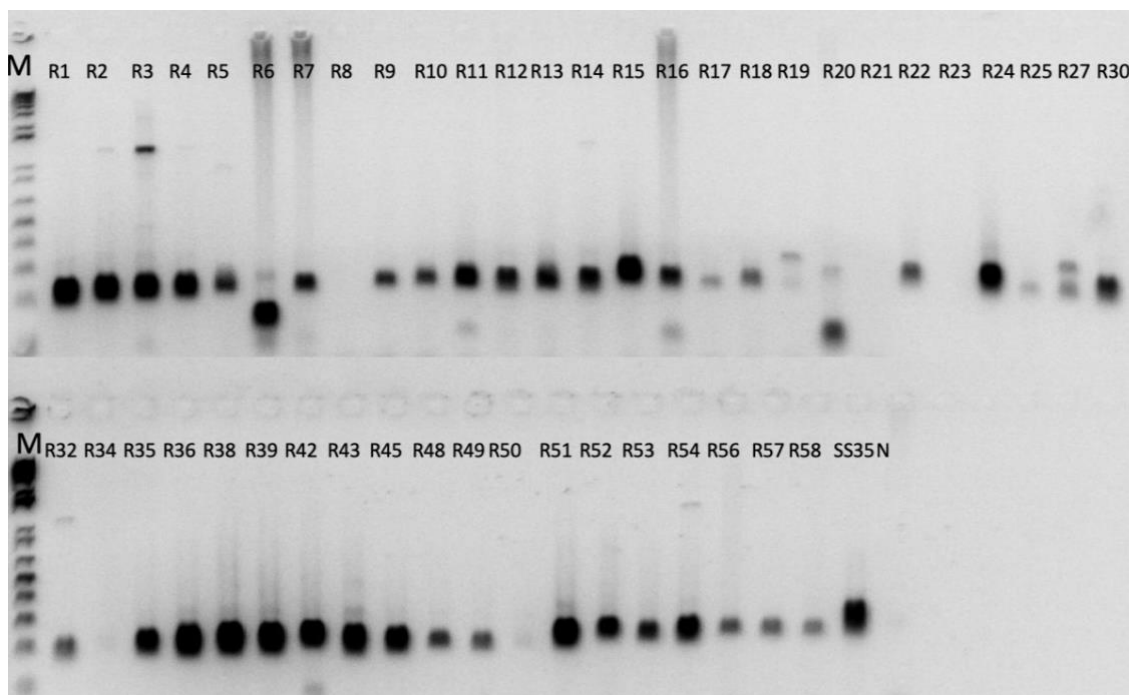


Figura 3. Verificación del producto de amplificación de las muestras del banco de germoplasma del INIAP.

4.2. Screening de marcadores SSRs

En la figura 4 se observa un ejemplo del *screening* de los microsatélites, descritos en la Tabla 5. Los marcadores 137a, GB-RC-049, GB-RC-062, GB-RC-067, GB-RC-091, 263f, RhM0013, no presentaron producto de amplificación con una temperatura de anillamiento estándar de 53°C, por lo que se realizaron ensayos de gradientes de temperatura de 50°C a 60°C conforme a lo descrito en la metodología. Como se visualiza en la figura 5, no se observó producto de amplificación en las temperaturas ensayadas. En la parte B se observa un bandeo de tipo inespecífico fuera del rango de amplificación del marcador. La temperatura de anillamiento está reportada en 53°C para el grupo de marcadores con la denominación GB-RC, por lo que la falta de producto de amplificación puede darse por la ausencia de la secuencia blanco en las muestras utilizadas (alelo nulo). Los marcadores de las siglas descritas proceden de la especie *R. coreanus*, por lo que se puede inferir que no hay

transferibilidad de estos marcadores a la especie *R. glaucus* y a las otras especies de *Rubus* incluidas en este estudio, pese a que estos marcadores tienen un porcentaje de transferibilidad mínimo reportado de 56.7% para *R. crataegifolius* y otras especies de *Rubus* (Kyung, 2016; Lee, 2015).

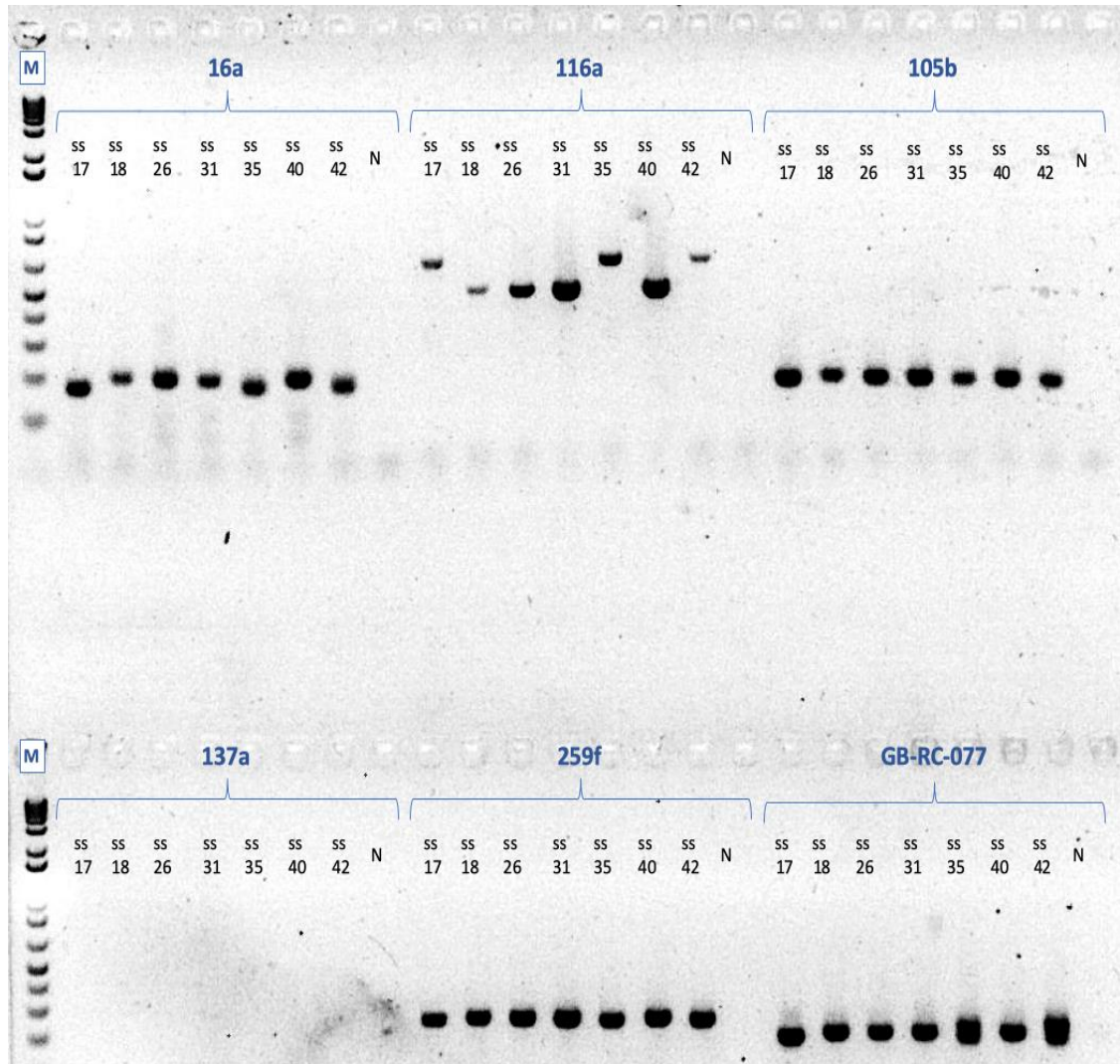


Figura 4. Amplificación en gel de agarosa de los cebadores

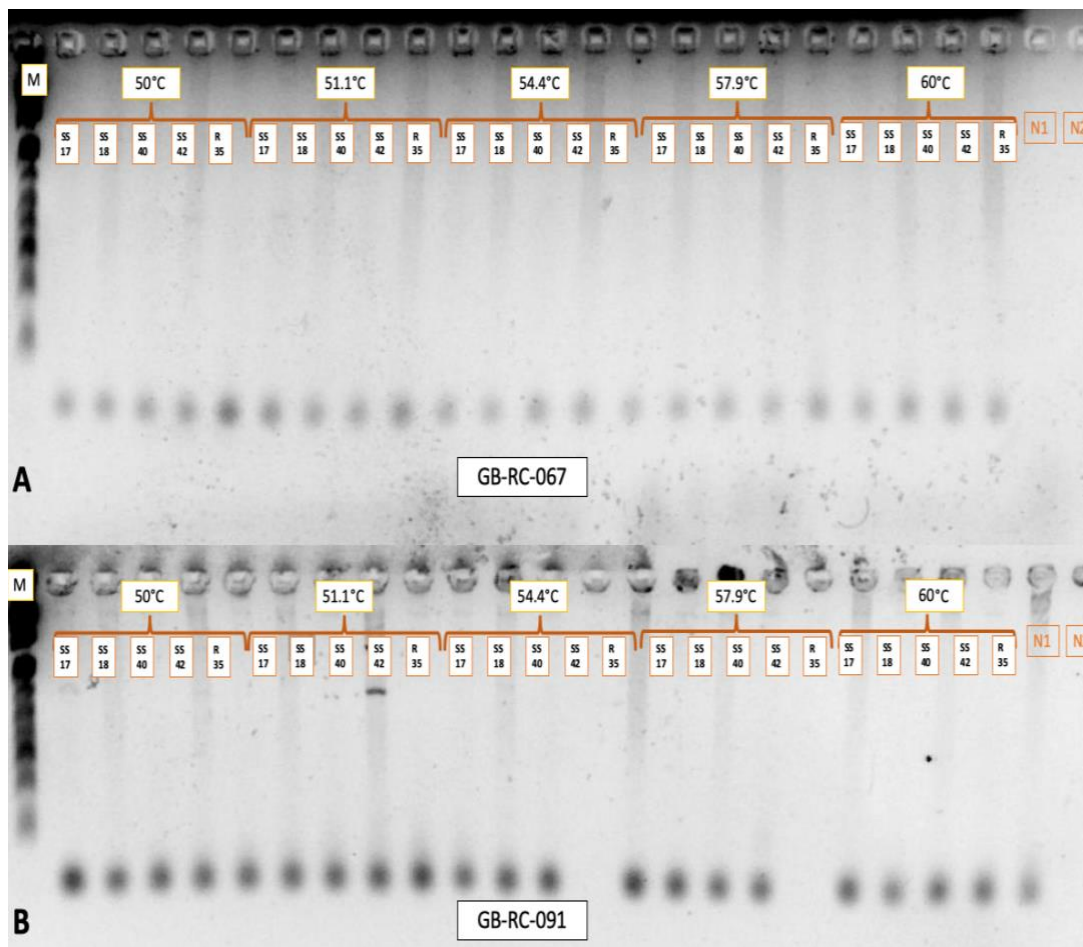


Figura 5. Gradientes de temperatura probados.

A) En GB-RC-067 no se observa producto de amplificación

B) GB-RC-91 no se observa producto de amplificación

Los marcadores 137a, 263f y RhM0013, tienen una temperatura de anillamiento de 50°C, 58°C y 51°C respectivamente. Con las pruebas de gradientes de temperatura, tampoco se obtuvo amplificación. Estos marcadores ya fueron probados en diferentes accesiones de *R. glaucus* en Colombia, por lo que se esperaba que haya transferibilidad a los materiales de *R. glaucus* del Ecuador. Sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados, estableciendo una diferencia entre las accesiones de *R. glaucus*, por el contrario el resto de marcadores presentó una buena transferibilidad, indicando una mayor similitud (Castillo, 2007; Marulanda, 2007, 2012).

4.2.1. Pruebas de marcadores con M13-tailing

Una vez descartados los marcadores que no amplificaron en las pruebas iniciales, se realizó el *screening* para determinar el polimorfismo con los marcadores descritos en la Tabla 5. Se representa en la figura 6, 7 y 8 las pruebas realizadas de amplificación. Se observa la selección de los marcadores que no obtuvieron una buena visualización, por lo que se aplicaron las modificaciones mencionadas en la metodología.

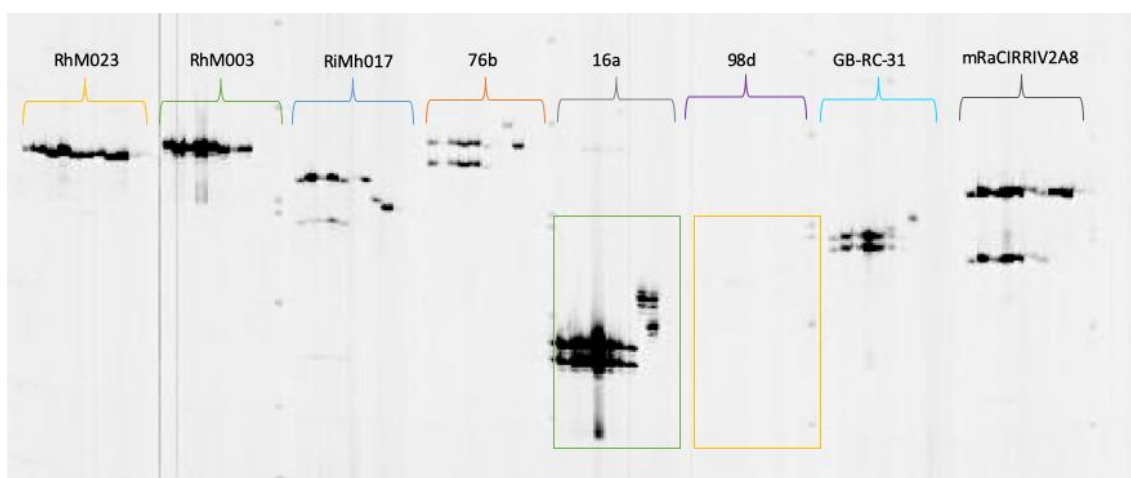


Figura 6. Se visualiza 8 marcadores, selección del 16a y 98d para pruebas de MgCl₂.

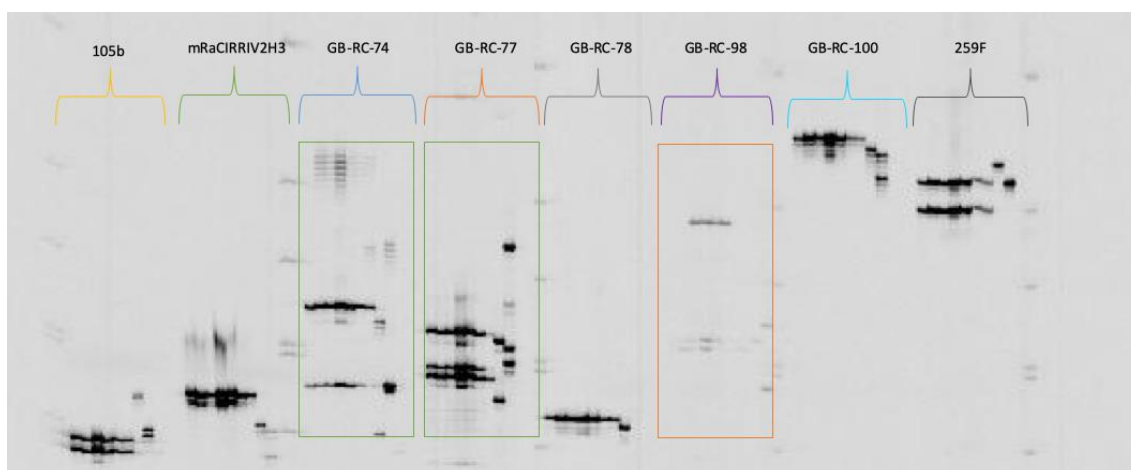


Figura 7. Se visualiza 8 marcadores, selección de GB-RC-74, GB-RC-77 y GB-RC-98 para las pruebas de MgCl₂.

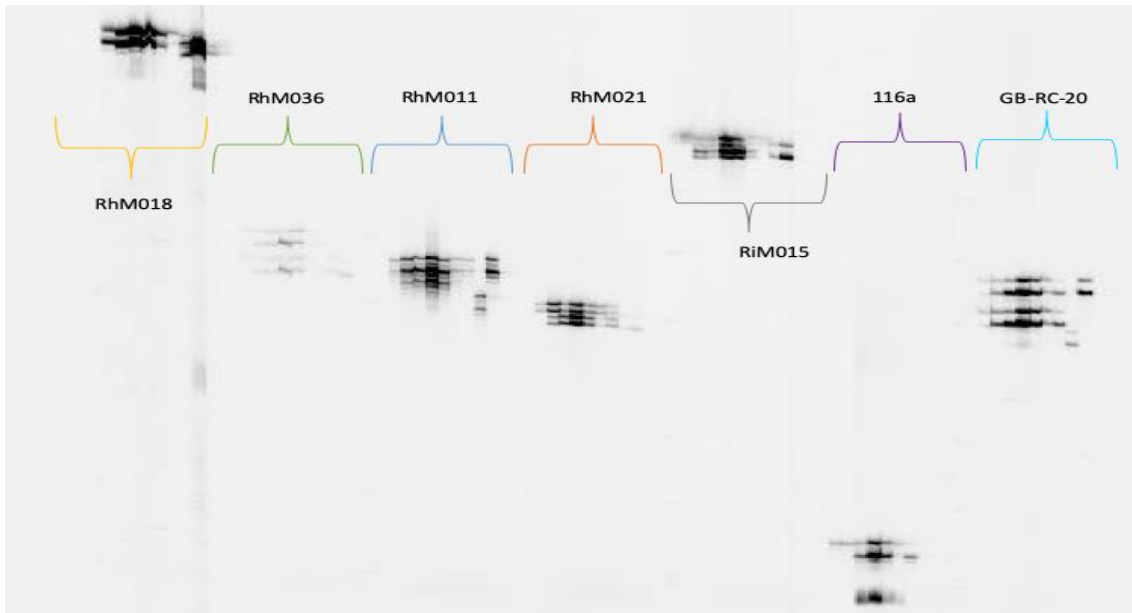


Figura 8. Se visualiza 7 marcadores debido al bandeo inespecífico todos pasan a pruebas de $MgCl_2$.

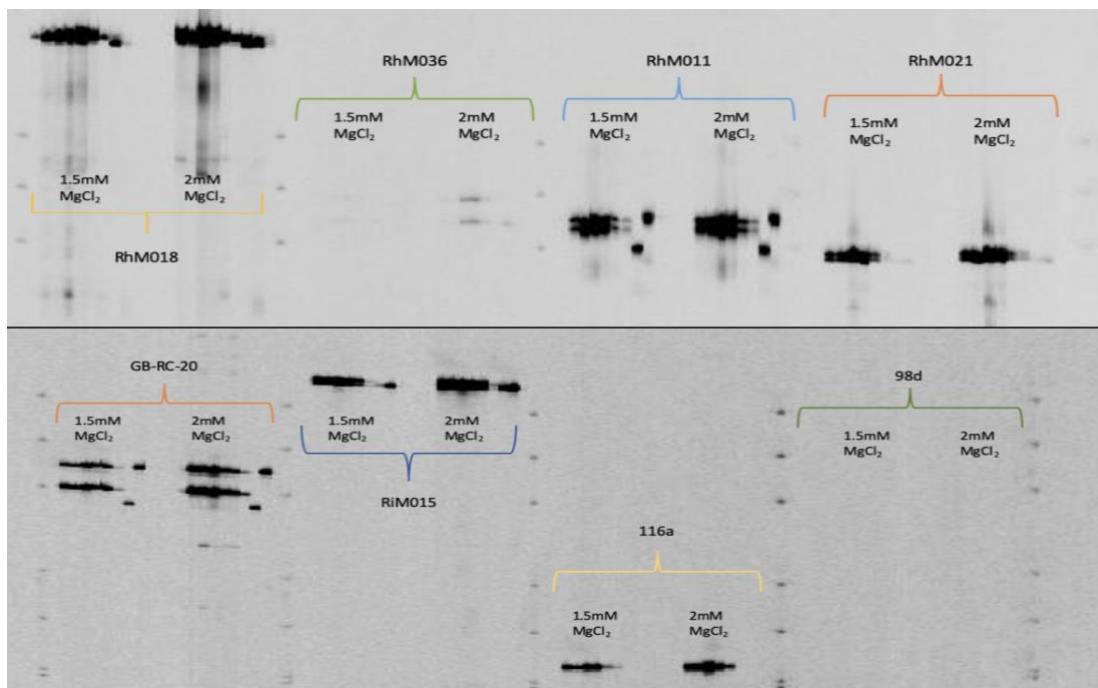


Figura 9. Ejemplificación del gel de poliacrilamida con las pruebas de $MgCl_2$.

En la figura 9 se constata que, al disminuir la concentración de $MgCl_2$, el producto de amplificación es más específico (Lai, 2015). Se realizaron las

pruebas para todos los marcadores en los que no se logró una clara visualización del producto de amplificación, de los cuales en el 98d y GB-RC-098 no se logró obtener el amplicón esperado pese a que en agarosa si se obtuvo amplificación. En el caso de GB-RC-074, este marcador mostró un bandeo que no se corrigió con las pruebas de $MgCl_2$. Esto puede ocasionar un mal genotipado, por lo que se eliminó de los análisis posteriores.

En la figura 10, se observan las pruebas de *multiplexing*. Se realizó las pruebas con un total de 10 combinaciones dúplex, de los cuales se validaron las combinaciones indicadas en la Tabla 8.

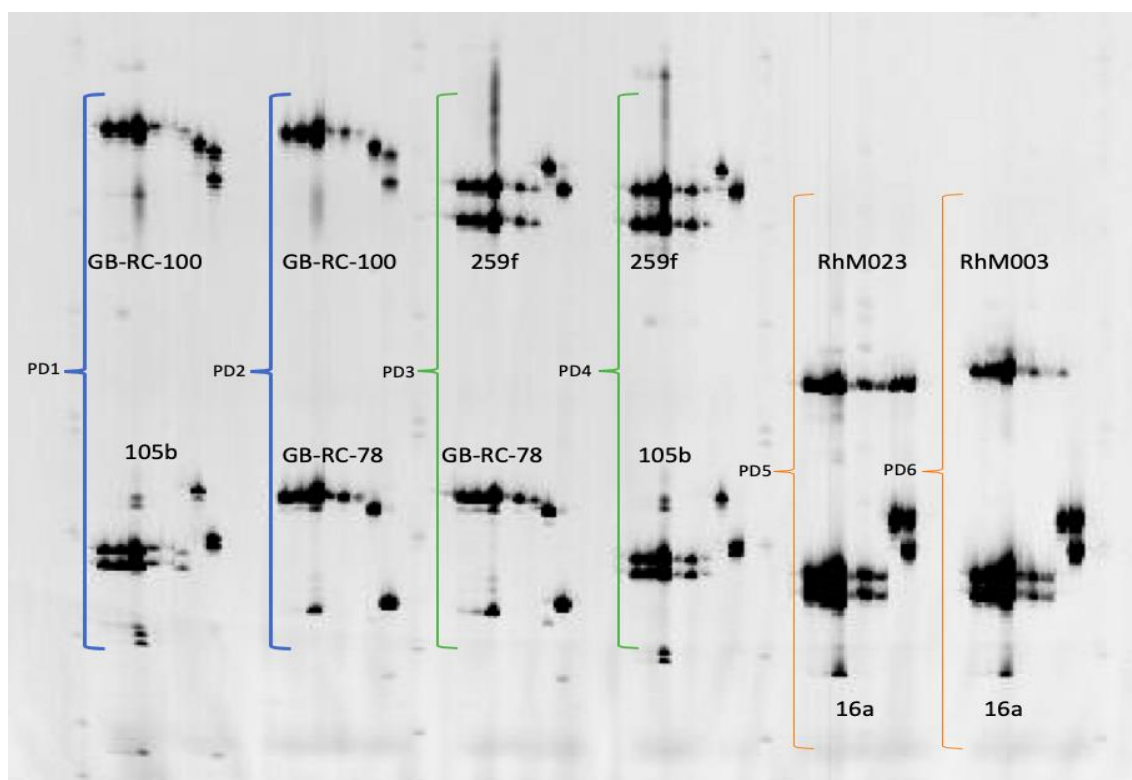


Figura 10. *Multiplexing* de marcadores, ejemplificación de los posibles dúplex.

Los resultados obtenidos del *screening* de los marcadores determinó la transferibilidad de un total de 20 microsatélites a las muestras de *Rubus* analizadas. En el proceso se descartaron 10 marcadores por falta de producto de amplificación, pese a las modificaciones realizadas en el programa y mix de PCR. En la Tabla 10 anteriormente reportada, se indican los marcadores seleccionados para los análisis de diversidad genética.

4.3. Análisis de diversidad

Para el análisis de diversidad genética se analizaron los datos obtenidos de un total de 135 muestras y 20 marcadores SSRs indicados previamente. Se obtuvo una matriz genotípica con el número de alelos para cada muestra y por cada marcador. La matriz se depuró según los *motifs* de cada marcador y los resultados se muestran en el Anexo 5. Con base en esta matriz se realizaron los análisis de diversidad, estructura genética, asignación de poblaciones e identificación de duplicados.

Se obtuvieron un total de 180 alelos SSR, con un promedio de 9,75 alelos/locus. Los tamaños para estos alelos oscilan entre 130pb a 381 pb. Los loci que presentan un mayor polimorfismo, con una mayor cantidad de alelos fueron los marcadores RhM011, GB-RC-077, mRaCIRRIH3, y GB-RC-100 con 15 a 22 alelos; a diferencia de los marcadores 116a y RhM023 con solo 2 alelos cada uno. El alelo más frecuente es el RhM011-298 pb, con un valor de frecuencia de 0,99. Existen alelos que solo se presentan en una muestra con una frecuencia de 0,003. En la Tabla 11 se detallan los resultados de las frecuencias alélicas obtenidas.

Tabla 11.

Resultados de los alelos encontrados por cada marcador

Microsatélites	Alelo reportado (pb)	Número de alelos	Alelos encontrados (pb)	Frecuencia alélica
GB-RC-078	178	11	139	0,068
			145	0,083
			148	0,214
			151	0,241
			157	0,368
			160	0,406
			163	0,444
			166	0,951
			169	0,977
			172	0,981
			181	0,030

GB-RC-100	203	16	223	0,007
			225	0,007
			235	0,030
			240	0,063
			242	0,188
			245	0,062
			247	0,006
			251	0,006
			257	0,235
			261	0,522
			265	0,037
			269	0,036
			273	0,019
			291	0,250
295	0,013			
297	0,020			
105b	158	12	150	0,175
			152	0,033
			154	0,331
			156	0,134
			158	0,073
			160	0,087
			162	0,026
			166	0,021
			168	0,040
			170	0,055
			172	0,016
			174	0,010
259-F	265	3	248	0,125
			260	0,250
			274	0,125
16a	169	3	159	0,250
			161	0,250
			165	0,500
RhM003	200	6	190	0,007
			194	0,013
			196	0,081
			198	0,006
			200	0,820
			202	0,074
RhM018	379	3	376	0,816
			379	0,175
			381	0,009
RhM021	282	4	278	0,491
			282	0,261
			284	0,178
			288	0,065

RiM015	350	4	338 344 350 353	0,019 0,693 0,246 0,030
116a	299	2	181 193	0,077 0,908
RhM023	196	2	187 196	0,068 0,932
RhM011	280	22	256 269 262 264 266 270 272 274 278 282 284 290 292 294 296 298 302 304 312 320 324 326	0,103 0,170 0,190 0,202 0,206 0,209 0,257 0,011 0,316 0,356 0,375 0,589 0,474 0,917 0,957 0,992 0,040 0,043 0,051 0,011 0,083 0,087
RiM017	194	5	180 182 186 188 194	0,247 0,004 0,019 0,444 0,286
RhM036	315	5	289 291 295 299 303	0,057 0,564 0,100 0,055 0,224
76b	250	7	174 176 192 200 206 212 218	0,078 0,003 0,114 0,209 0,425 0,271 0,011

mRaCIRRI1G3	239	6	175 177 179 181 185 187	0,081 0,272 0,010 0,399 0,148 0,090
mRaCIRRIH3	182	15	130 136 142 148 150 152 154 156 158 162 168 176 186 194 214	0,013 0,013 0,032 0,229 0,006 0,090 0,032 0,048 0,027 0,013 0,432 0,013 0,013 0,019 0,019
mRaCIRRIV2A 8	201	5	175 191 195 199 201	0,232 0,043 0,683 0,032 0,011
GB-RC-020	293	11	230 233 239 272 281 287 290 293 296 299 302	0,023 0,050 0,005 0,081 0,246 0,036 0,063 0,417 0,056 0,009 0,014

GB-RC-077	192	16	171	0,036
			174	0,003
			177	0,391
			180	0,016
			183	0,026
			186	0,005
			189	0,022
			192	0,220
			195	0,036
			201	0,170
			207	0,005
			216	0,022
			222	0,114
			225	0,023
			228	0,023
231	0,068			

En la tabla 12 se visualizan, los parámetros de diversidad genética para toda la colección de mora definido por cada marcador. Se observa la heterocigosis esperada (He), heterocigosis observada (Ho), contenido de información polimórfica (PIC), la disponibilidad de los locus, y el total de observaciones analizadas en comparación del número de muestras procesadas. En promedio se obtuvo una He de 0,66 con un índice de polimorfismo de 0,624. El marcador más informativo fue el RhM011 con una heterocigosis esperada de 0,863 y un contenido de información polimórfica de 0,852. El marcador menos polimórfico es el RiM003 con un índice de polimorfismo de 0,393 y heterocigosis esperada de 0,42. El marcador 116a tiene un bajo índice polimórfico de 0,432 y no presentó Ho, siendo un marcador en su mayoría homocigoto para las accesiones.

Tabla 12.

Parámetros de diversidad genética observados en las muestras de mora.

Marcador	Nº. de muestra	Nº. de obs	Disponibilidad	He	Ho	PIC
76b	135	130	0,963	0,739	0,662	0,702
RhM011	135	131	0,970	0,863	0,702	0,852
RiM017	135	125	0,926	0,687	0,360	0,627
RhM023	135	132	0,978	0,149	0,114	0,143

RhM036	135	114	0,844	0,686	0,456	0,649
mRaCIRRI1G3	135	134	0,993	0,751	0,567	0,715
mRaCIRRIV2A8	135	135	1,000	0,561	0,496	0,511
mRaCIRRIH3	135	132	0,978	0,726	0,205	0,702
GB-RC-020	135	131	0,970	0,746	0,664	0,714
GB-RC-077	135	133	0,985	0,789	0,684	0,764
GB-RC-078	135	133	0,985	0,701	0,316	0,678
GB-RC-100	135	131	0,970	0,712	0,130	0,681
259-f	135	134	0,993	0,779	0,657	0,755
105b	135	132	0,978	0,822	0,591	0,804
16a	135	133	0,985	0,841	0,684	0,824
RhM003	135	132	0,978	0,420	0,129	0,393
RhM018	135	130	0,963	0,503	0,162	0,453
RhM021	135	130	0,963	0,711	0,600	0,669
116a	135	119	0,881	0,538	0	0,432
RiM015	135	135	1,000	0,472	0,496	0,413
Promedio	135	130,3	0,965	0,660	0,434	0,624

Nota: N de obs. (número de observaciones), PIC (contenido de información polimórfica), He (heterocigosis esperada), Ho (heterocigosis observada).

En general, se puede determinar que los SSRs que presentan un mayor número de alelos generan una mayor heterocigosis y un elevado índice PIC, sugiriendo una correlación proporcional entre estos parámetros.

Estos resultados revelan un moderado número de alelos por locus (9,75), con un rango de 2-22 alelos y un índice PIC de 0,624. Sin embargo, en un estudio realizado en 69 accesiones de *R. coreanus*, *R. crategifolius*, *R. fruticosus*, *R. idaeus* y *R. parvifolius* con 23 SSRs presentan un número de 15,3 alelos por locus con un rango de 6-26 alelos, presentando un elevado valor PIC (0,76) que en comparación con los resultados obtenidos, muestra un mayor polimorfismo en las accesiones (Kyung, 2016). Por otra parte, en un estudio realizado por Dossett, (2012) se reporta un menor número de alelos por locus

(8,6) con un rango de 2-24 alelos en 146 accesiones de frambuesa negra silvestre y cultivada, reportando un valor PIC de 0,49 con 21 SSRs. Además Marulanda, (2012) reportó en 44 accesiones de *R. glaucus* con 20 SSRs un número menor de 3,25 alelos por locus con un rango de 1-6 alelos y un valor promedio de PIC de 0,45. En un estudio más reciente de Lee, (2015) se reportó en *Rubus spp.* con 29 SSRs un número de alelos por locus de 9,6 con un rango de 4-15 alelos y un valor promedio de PIC de 0,803. Según los resultados de estos estudios, el índice polimórfico influye significativamente en la diversidad del género *Rubus* y la presencia de alelos, mostrando una amplia gama de los índices genéticos. Ubicando a los resultados obtenidos en un punto medio entre los estudios realizados, se determinó que al usar muestras silvestres, aumenta la variabilidad alélica que eleva de igual manera el resto de índices, como se muestra en los casos descritos. En comparación al estudio realizado con la especie *R. glaucus* descrito por Marulanda, (2012) se identifica una menor presencia de alelos, lo que sugiere una pérdida de la variabilidad alélica para estos loci en la especie. Además, se determinó con estos índices una buena transferibilidad de los SSRs a las muestras de *Rubus* analizadas en el presente estudio.

Uno de los microsatélites más informativos es el marcador RhM011, con una amplia disponibilidad en los materiales analizados, presentando una Ho de 0,702 y un índice PIC de 0,852, en comparación con el análisis realizado por Marulanda, (2012), en donde en muestras de mora, el valor de heterocigosidad que presentó fue de 0,969 y un valor PIC de 0,5419, determinando una mayor heterocigosidad, pero un menor polimorfismo en comparación con los resultados obtenidos. Gracias a esto, se puede inferir que este microsatélite es muy informativo para el género *Rubus*. Esto es corroborado con análisis realizados por Bushakra, (2015), Castillo, (2007) y Kyung, (2016) en accesiones cultivadas y silvestres de *R. occidentalis L.*, *Rubus spp.* y *R. coreanus* respectivamente, donde se identifican este marcador como el más informativo para el género *Rubus*.

El marcador RhM003 tiene el menor índice de PIC (0,393) y una

heterocigosidad observada de 0,129, en comparación con los análisis reportados por Marulanda, (2012) tiene un índice PIC de 0,047 y un H_o de 1. Esta información muestra que los alelos para este locus son conservados con un bajo polimorfismo, siendo un marcador universal para *Rubus* (Castillo, 2007; Ryu, 2014; Wang, Cobine, & Coleman, 2018).

Los SSRs: GB-RC-20, GB-RC-77, GB-RC-78 y GB-RC-100 obtuvieron valores de H_o (0,664; 0,684; 0,316 y 0,130) menores en comparación con los valores reportados de los mismo SSRs para *R. coreanus* de H_o (0,607; 0,742; 0,774 y 0,548), determinando una menor heterocigosis, pese a una mayor presencia de alelos, por lo que se infiere una mayor presencia de alelos homocigotos. Se conoce que *R. glaucus* es una especie que debido a su reproducción, mantiene clones por estaca de una planta madre, al contrario de las muestras silvestres, que se reproducen no solo por estacas, sino por semillas, lo que explicaría la presencia de diferentes niveles de ploidía, lo cual explica la amplia gama alélica especificada en la tabla 9 (Lee, 2015; Miyashita, 2015; Rodríguez Bautista, 2018).

Para los marcadores RiM015, RhM018, RhM021, RhM023 y RiM017, se obtuvo una menor H_o (0,496; 0,161; 0,6; 0,114 y 0,36), en comparación con la heterocigosis esperada. En estudios realizados en accesiones de Colombia de *R. glaucus*, los valores de H_o (0,632; 0,488; 1,0; 0,824 y 0,919) son de igual manera superiores, demostrando una menor heterocigosidad en las accesiones del estudio, diferenciando así que para estos SSRs hay una variabilidad alélica buena, con una heterocigosis observada menor a la esperada. Esto podría deberse a que los valores obtenidos son un promedio de todas las especies analizadas, en donde se ha identificado que las accesiones de *R. glaucus* tienen una tendencia a la homocigosis, y las muestras silvestres a ser heterocigotas (Acuña-Rodríguez, 2018; Alarcón, 2018; Marulanda, 2007, 2012; Rodríguez Bautista, 2018).

4.3.1. Análisis de estructura

En la figura 11, se observa el análisis PcoA en el que se identifican dos grupos,

diferenciados, con una varianza de 35,7% entre los grupos. Las muestras diferenciadas como *R. glaucus* se agrupan estrechamente y se diferenciaron de las especies silvestres que evidencian una mayor heterogeneidad a lo largo del segundo eje de varianza.

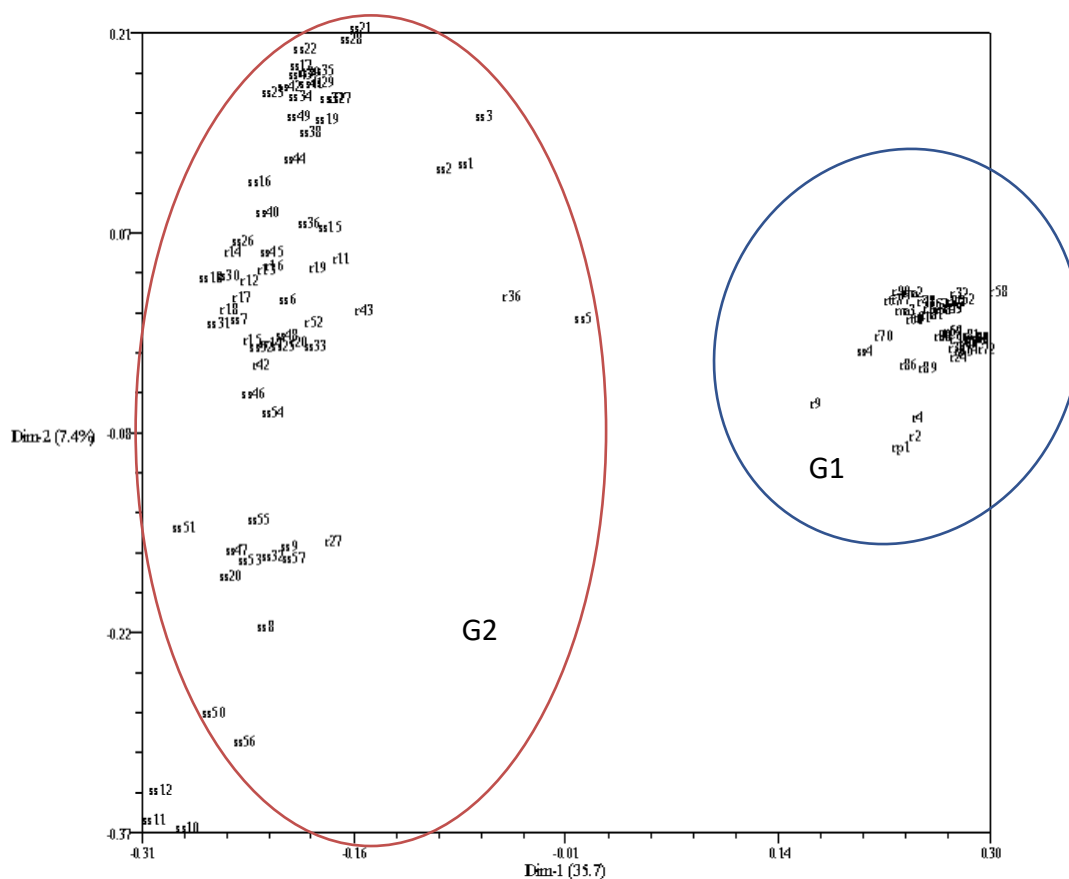


Figura 11. Análisis PCoA, de las muestras analizadas con la separación de los grupos.

La muestra ss4 silvestre se separa en el grupo G1, que en su mayoría son especies diferenciadas como *R. glaucus*, lo que sugiere que es un genotipo similar a *R. glaucus*. En otros estudios realizados muestras identificadas como *R. urticifolius*, *R. niveus*, *R. roseus* y *Rubus spp.* se han separan en el grupo de muestras silvestres, sugiriendo que estas pueden ser mejor adaptadas a los ambientes silvestres. Además, pueden tener duplicados genéticos en la naturaleza y ser parte de cultivos también (Clark & Finn, 2011; Hernández-Bautista, 2018; Rodríguez Bautista, 2018).

En segundo lugar, se generó el dendograma representado en la figura 12 de todas las especies analizadas, que concuerda con el análisis PcoA, en el cual se determinaron dos grupos bien diferenciados, corroborando los resultados obtenidos anteriormente. La codificación de los genotipos se describe en la Tabla 13.

Tabla 13.

Codificación de las muestras del dendograma y en el análisis de asignación de estructura.

No.	Código	No.	Código	No.	Código	No.	Código	No.	Código	No.	Código
1	ma1	24	r35	47	r63	70	r9	93	ss22	116	ss43
2	ma2	25	r36	48	r64	71	r90	94	ss23	117	ss44
3	ma3	26	r38	49	r67	72	r91	95	ss24	118	ss45
4	r1	27	r39	50	r68	73	r92	96	ss25	119	ss46
5	r10	28	r4	51	r69	74	r93	97	ss26	120	ss47
6	r11	29	r42	52	r70	75	r94	98	ss27	121	ss48
7	r12	30	r43	53	r71	76	r95	99	ss28	122	ss49
8	r13	31	r45	54	r72	77	r96	100	ss29	123	ss5
9	r14	32	r48	55	r73	78	r97	101	ss3	124	ss50
10	r15	33	r49	56	r74	79	ss1	102	ss30	125	ss51
11	r16	34	r5	57	r75	80	ss10	103	ss31	126	ss52
12	r17	35	r51	58	r76	81	ss11	104	ss32	127	ss53
13	r18	36	r52	59	r77	82	ss12	105	ss33	128	ss54
14	r19	37	r53	60	r78	83	ss13	106	ss34	129	ss55
15	r2	38	r54	61	r79	84	ss14	107	ss35	130	ss56
16	r20	39	r56	62	r81	85	ss15	108	ss36	131	ss57
17	r22	40	r57	63	r83	86	ss16	109	ss37	132	ss6
18	r24	41	r58	64	r84	87	ss17	110	ss38	133	ss7
19	r25	42	r59	65	r85	88	ss18	111	ss39	134	ss8
20	r27	43	r6	66	r86	89	ss19	112	ss4	135	ss9
21	r3	44	r60	67	r87	90	ss2	113	ss40		
22	r30	45	r61	68	r88	91	ss20	114	ss41		
23	r32	46	r62	69	r89	92	ss21	115	ss42		

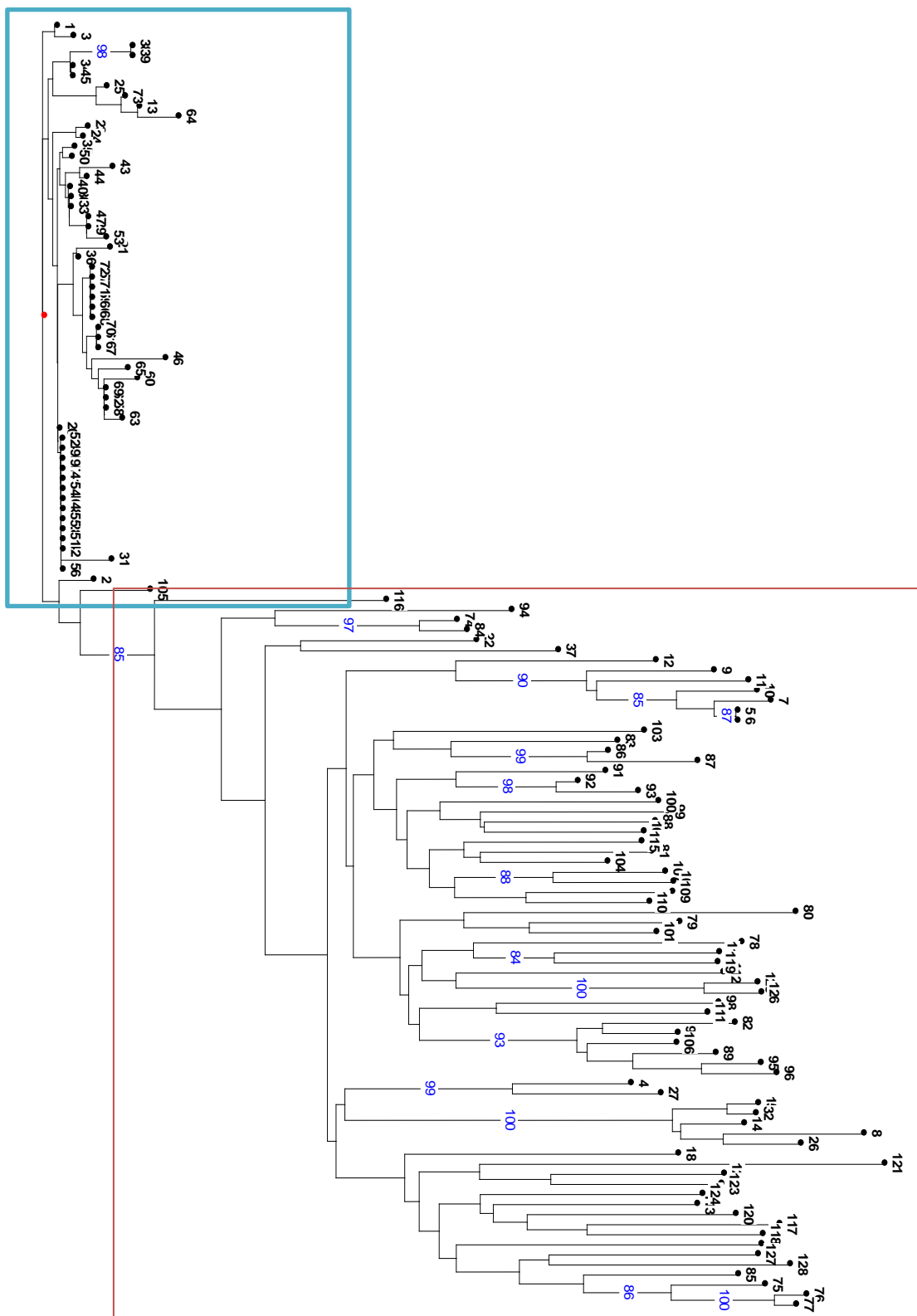


Figura 12. Dendrograma NJ obtenido como resultado para el total de las muestras

En color azul G1 y anaranjado G2. Se indican los valores *bootstrap* significativos (>80)

obtenidos en color azul.

Los resultados del análisis de estructura se observan en la figura 13, en donde se obtuvo un Δk igual a 2, agrupando en dos poblaciones las accesiones de *Rubus*. En base al resultado obtenido de k se diferenciaron dos poblaciones denotadas en color rojo (G1) y verde (G2). Los resultados de probabilidad asignados por el programa se visualizan en Anexo 6, y la codificación de las muestras en la tabla 13 anteriormente presentada.

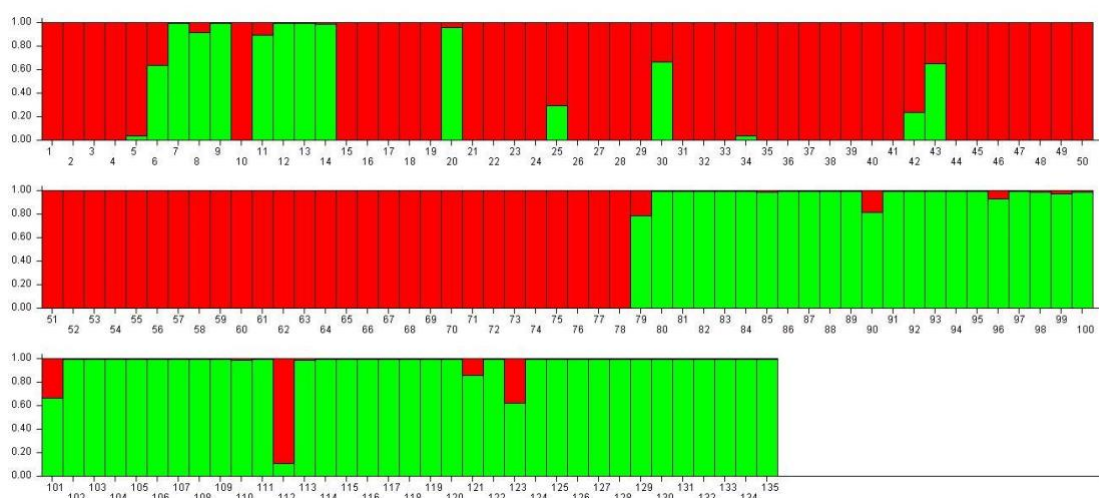


Figura 13. Asignación poblacional de todas las accesiones de mora

Se identificaron muestras que comparten genotipos intermedios entre las dos poblaciones. Estos genotipos se asignaron por sus valores de probabilidad a la población con mayor cercanía. Las muestras r10 (5), r36 (25), r5 (34), r59 (42), ss4 (112), tienen una probabilidad superior a 0,7 de pertenecer a G1, siendo este grupo muy conservado, con una probabilidad cercana a 1, siendo una población más homogénea. Por otro lado, el G2 tiene muestras más heterogéneas, con una probabilidad mayor a 0,6 de pertenecer a dicho grupo.

Este resultado corrobora el PCoA y el dendrograma que determinaron dos poblaciones bien diferenciadas (G1 y G2), en donde las muestras de *R. glaucus* se separaron con una elevada varianza del resto de las muestras de *Rubus*. Sin embargo, se puede observar el flujo genético en ciertas muestras

que presentan una menor probabilidad de pertenecer a una u otra población.

En un estudio realizado por Dotor, (2016) con muestras de *Rubus spp.* y *R. glaucus* concluyeron que se refleja un flujo de genes que puede darse por el mecanismo de reproducción. Además determinaron una elevada similitud (0,6 a 0,8) en las especies cultivadas, independientemente de su origen de colecta. En este estudio, las muestras de G1 tienen una similitud superior (0,7 a 1) lo que sugiere la presencia de varios duplicados genéticos; de igual manera las muestras silvestres tienen una similitud moderada que va de 0,6 a 0,9. Sin embargo, se ve reflejado el flujo genético con una tendencia de las muestras cultivadas a las silvestres.

Con base a este análisis, la población G1 agrupa a las muestras de *R. glaucus*, y se puede denotar accesiones que comparten una baja similitud con las muestras del G2, por lo que la población G1 se analizó para determinar si existe una estructura genética intraespecífica en *R.glaucus*.

4.3.2. Análisis de estructura en el grupo G1

El análisis de estructura se llevó a cabo con los mismos parámetros generales, con un total de 61 muestras procesadas. En el Anexo 7 se puede observar las muestras escogidas. Debido a los datos perdidos se descartaron cinco muestras del total diferenciado como G1. En primer lugar, se determinó el análisis de componentes principales (PCoA) utilizando el coeficiente de similitud (*Simple Match Coefficient*). En la figura 14 se observa el análisis de PcoA en donde se identificó la conformación de dos subgrupos diferenciados por la primera coordenada de varianza que extrae un 52,7% del total de variación observada. También se identificaron varias muestras que se sobreponen lo cual sugiere duplicados genéticos.

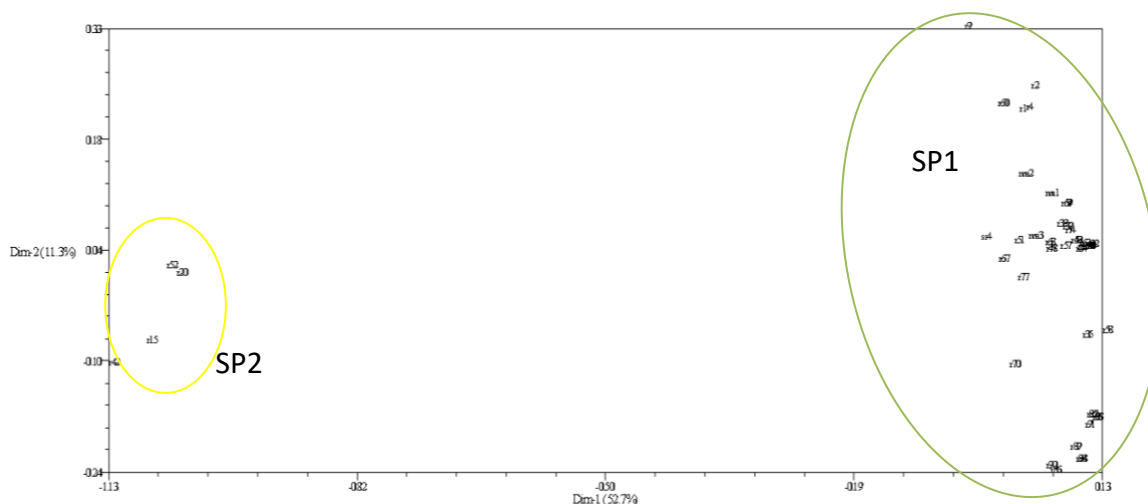


Figura 14. Análisis PcoA, para todas las muestras de G1

En el círculo verde se observan las muestras identificadas como SP1 y en el círculo amarillo se observa a SP2. El análisis de asignación poblacional se llevó a cabo con los mismos parámetros generales y se obtuvo una matriz de probabilidad (Anexo 7). La representación gráfica de las probabilidades dividió a *R.glaucus* en dos subpoblaciones (Figura 15), con una probabilidad cercana a 1 para los dos grupos genéticos.

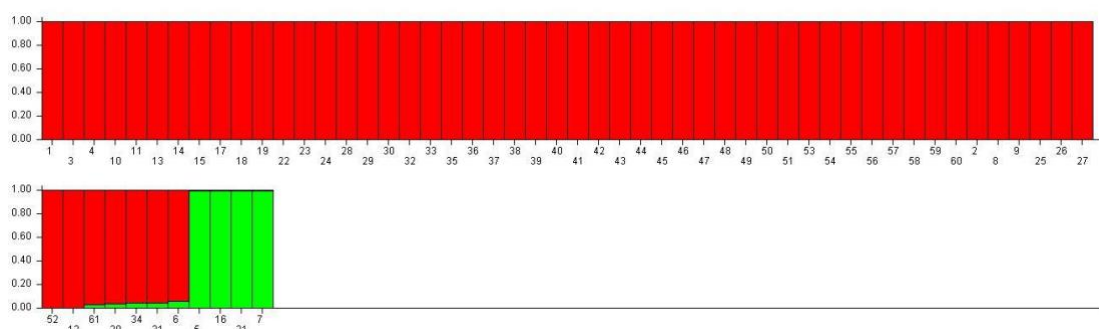


Figura 15. Asignación poblacional las accesiones de *R.glaucus*

Las muestras que se visualizan en color rojo se denotan como SP1 y las muestras de color verde como SP2, en concordancia con el análisis PcoA. Las dos subpoblaciones se separaron con una diferencia bien marcada. Se constató que no todas las muestras dentro de este análisis pertenecen a *R. glaucus*, ya que hay dos muestras r15 (5) y r20 (7) identificadas como *R. niveus* Thombs y la muestra ss4 que pertenece a las recolectadas sin identificación,

por lo tanto al realizar este análisis, se sugiere una similitud cercana a *R. glaucus*, la cual se comprueba con el AMOVA.

Las evidencias de estructura genética en *R. glaucus* han sido previamente reportadas: según Marulanda & Lopez, (2009), la especie *R. glaucus* se separó en cuatro grupos compartiendo similitudes con otras especies; el primer grupo presentó una alta similitud con *R. urticifolius*; en un segundo subgrupo con menor similitud se agrupó con *R. rosifolius*, *R. urticifolius* y *R. robustus* y un tercer grupo con una similitud de 0,7 agrupó la especie con *R. urticifolius* y *R. robustus*. Sin embargo, en un estudio posterior de Duarte, Chacón, Núñez, & Barrero, (2011) se mostró una separación marcada de *R. glaucus* de otras especies y donde se incluyen accesiones con y sin espinas. Esto se confirma por Marulanda, (2012) en donde la especie *R. glaucus* tiene una elevada similitud entre diferentes accesiones de varias regiones. En un estudio realizado en Ecuador se muestra una estructura en *R. glaucus* en dos grupos genéticos en base a un *screening* con marcadores AFLPs (Datos no mostrados).

4.3.3. Análisis molecular de varianza

En la tabla 14 se muestra el AMOVA y los estadísticos *F* obtenidos para los análisis realizados. En el análisis global de datos se determina una diferencia significativa del 13% ($F_{st}= 0,128$) entre las poblaciones. Sin embargo, hay una mayor variabilidad dentro de los grupos del 87%. Por otro lado, el análisis de las subpoblaciones de G1 mostraron una diferencia entre las poblaciones de 52% ($F_{st}= 0,521$) y una menor variabilidad dentro de las poblaciones del 48%. En concordancia con los análisis PCoA, los dos grupos de análisis de poblaciones mostraron una marcada diferencia entre los grupos. En segundo lugar, las accesiones perteneciente a *R. glaucus* son más distantes a las otras especies de *Rubus* analizadas, y dentro de *R. glaucus* se confirma la existencia de dos subgrupos altamente diferenciados. Al comparar estos dos subgrupos denotados como SP1 y SP2 con la primera población que comprende las muestras recolectadas denotadas como silvestres, se identifica que SP2 tiene

una mayor cercanía a la población silvestre en comparación con SP1.

En el estudio realizado por Kyung, (2016), se determinó una alta variabilidad genética entre y dentro de las especies *Rubus*, lo cual puede darse por la variación individual y el sistema de propagación. Además, estos autores demostraron que hay un efecto de polinización cruzada entre las especies poliploides de *Rubus* lo que aumenta la variabilidad dentro de las poblaciones y permite una diferenciación pronunciada en una especie conservada (Marulanda, 2007; Miyashita, 2015; Vujović, Ruzic., 2017).

En el estudio realizado por Marulanda, (2012), la varianza molecular en *R. glaucus* mostró una variabilidad entre poblaciones del 10% y dentro de las poblaciones del 90%, en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, donde la variabilidad entre las poblaciones es mayor, por lo tanto están más diferenciadas, y con una mayor similitud dentro de las poblaciones. Este resultado confirma la existencia de dos subpoblaciones en *R. glaucus* y el flujo genético entre las especies.

Tabla 14.

Análisis estadístico de variabilidad genética para las poblaciones identificadas

Poblaciones a comparar	AMOVA(% de variación)		Estadístico F		
	Entre poblaciones	Dentro de las poblaciones	F_{st}	F_{is}	F_{it}
Cultivadas (G1) vs Silvestres (G2)	13	87	0,128*	-0,267***	-0,124***
SP1 vs SP2	52	48	0,521**	0***	0,365*
SP1 vs silvestres	13	87	0,161*	0*	0*
SP2 vs silvestres	8	92	0,085*	0,304*	0,35*

Nota: F_{st} (índice de fijación, proporción de la diversidad genética entre poblaciones), F_{it} (índice de endogamia total), F_{is} (índice de endogamia intrapoblacional). Probabilidad *moderada; **grande; *** elevada, (Según Wright, 1965).

Los índices F_{is} y F_{it} altamente significativos dentro de las poblaciones cultivadas y silvestres demostraron que hay una buena heterocigosis, favoreciendo la

exogamia. Además sugiere efectos de divergencia al azar de las poblaciones y una combinación de los efectos intra e interpoblacionales, determinada por F_{st} . Estos resultados afirman los obtenidos de H_o y la diferencia poblacional indicada en el AMOVA. Por otra parte, en el análisis de los subgrupos de G1 se observa un índice de fijación de endogamia total de 0,365, lo que sugiere de igual manera una combinación de efectos intra e interpoblacionales; el índice F_{is} sugiere una panmixia con una heterocigosis conservada. Además, el índice de fijación moderadamente significativo indica una fijación alélica para las subpoblaciones. Estos índices mostraron una heterocigosidad estable dentro de las poblaciones, lo cual a su vez determina la estabilidad de las dos subpoblaciones (Amsellem, 2001; Castillo, 2007; Dossett, 2012; Kyung, 2016; Ryu, 2018).

Los resultados de endogamia de las dos subpoblaciones de *R. glaucus* se corroboran con varios índices bajos de heterocigosis, mencionados anteriormente (Tabla 12). De igual manera, en el análisis de duplicados genéticos se identificó que las muestras r24, r25, r30, r32, r45, r58, r63, r64, r71, r72, r73, r75, r76, r78, r79, r81, r93, r94, r95, r96, r97 y ss4 tienen una similitud del 100%. El restante de las muestras tienen una similitud que va de 54,55% a 97%, lo que sugiere una heterocigosis conservada o una pérdida alélica por efectos de la endogamia (Fernández, 2011; Marulanda & Lopez, 2009; Marulanda, 2012).

De manera general, los resultados reflejan una población de *Rubus* con una heterocigosis muy variable. Sin embargo, separa a la especie *R. glaucus* del resto de especies, con una menor heterocigosis observada. En segundo lugar, los marcadores SSRs utilizados tienen una buena transferibilidad a las especies de *Rubus* del Ecuador y se observa la presencia de genotipos ampliamente distribuidos. En tercer lugar, la especie *R. glaucus*, independientemente del lugar es conservada, presentando una similitud en varias de las accesiones. Por último se observan dos grupos bien diferenciados en *R. glaucus* lo que sugeriría la existencia de dos posibles subespecies.

5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se probó un total de 30 microsatélites, en donde en las primeras pruebas se descartaron 7 marcadores, debido a que no se logró la estandarización del mix y el programa de PCR. En las pruebas de M13 *tailling* se descartaron 3 marcadores, debido a que no se visualizó claramente los locus y esto podía inducir en errores para los análisis posteriores. En conclusión se logró la estandarización de 20 microsatélites que mostraron un buen polimorfismo, resultando útiles para el genotipado de mora incluyendo a la especie *R.glaucus*.

En los análisis de diversidad se obtuvo un índice polimórfico promedio de 0,624, identificándose un total de 180 alelos, y una heterocigosis promedio observada de 0,434. Representada en su mayoría por las especies silvestres del género *Rubus*. Las accesiones de *R. glaucus* analizadas tuvieron una variabilidad genética inferior en comparación con el restante de las muestras de *Rubus*. Además se determinó una similitud en las accesiones de *R. glaucus* hasta de un 100%, mostrando duplicados genéticos. Lo cual sugiere una pérdida genética dada por la endogamia presente en los monocultivos y la reproducción de clones por estaca. Sin embargo, la especie se separó en dos subgrupos con una elevada variabilidad entre las subpoblaciones.

El análisis molecular de varianza determinó de manera global una buena varianza entre las poblaciones de 13% ($F_{st}=0,128$), con una gran variabilidad dentro de estas. Por otro lado el análisis de las subpoblaciones de G1 mostró una gran diferencia entre las poblaciones del 52%, diferenciando a dos subpoblaciones denotadas como *R. glaucus* o cercanas a esta. Además se determinó un posible flujo genético dado por especies intermedias en los análisis que finalmente se agruparon en las especies de *Rubus* silvestres.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda identificar las especies silvestres, ya que varias accesiones identificadas como *R. niveus* Poir, *R. urticifolius*, *R. niveus* Thombs. se agruparon en G2.

Se recomienda completar el análisis de variabilidad genética es necesario ser complementado con el análisis cromosómico y cloroplástico.

Se recomienda establecer un programa de mejoramiento genético con especies silvestres para *R. glaucus* para el incremento de variabilidad genética en este rubro.

REFERENCIAS

- Acuña-Rodríguez, I. S., Gouin, N., Cifuentes-Lisboa, L., & Squeo, F. A. (2018). *Isolation and cross-amplification of the first set of polymorphic microsatellite markers of two high-Andean cushion plants. Journal of Genetics*. Recuperado el 10 de enero de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s12041-018-0999-4>
- Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., & Johnson, D. V. (2016). *Advances in plant breeding strategies: Agronomic, abiotic and biotic stress traits. Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits* (Vol. 2). Recuperado el 3 de marzo del 2019 de <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22518-0>
- Alarcón, K. S., Armijos, D. S., García, M., Iturralde, G., Jaramilo, T., Granda, M. G., ... Alvarez, J. M. (2018). *Wild Andean blackberry (Rubus glaucus Benth) and Andean blueberry (Vaccinium floribundum Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. Journal of Berry Research*. Recuperado el 4 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.3233/JBR-180316>
- Amsellem, L., Dutech, C., & Billotte, N. (2001). *Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Rubus alceifolius Poir. (Rosaceae), an invasive weed in la Réunion island. Molecular Ecology Notes*, 1(1–2), 33–35. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00013.x>
- Bushakra, J. M., Bryant, D. W., Dossett, M., Vining, K. J., VanBuren, R., Gilmore, B. S., ... Bassil, N. V. (2015). *A genetic linkage map of black raspberry (Rubus occidentalis) and the mapping of Ag4 conferring resistance to the aphid Amphorophora agathonica. Theoretical and Applied Genetics*, 128(8), 1631–1646. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2541-x>
- Campbell, T. F., McKenzie, J., Murray, J. A., Delgoda, R., & Bowen-Forbes, C. S. (2017). *Rubus rosifolius varieties as antioxidant and potential chemopreventive agents. Journal of Functional Foods*, 37, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.040>

- Capel, J., & Yuste, F. (2016). *Manual de prácticas de Bioinformática*. (E. U. Alameria, Ed.) (quinta). Alameria, España.
- Castillo, N., Reed, B., & Bassil, N. (2007). *Fingerprinting and Genetic Stability of Rubus Using Molecular Markers*. HortScience. Oregón, USA.
- Clark, J. R., & Finn, C. E. (2011). *Blackberry Breeding and Genetics*. In *Blackberry Breeding and Genetics John R. Clark* (p. 17). Oklahoma, USA.
- Culley, T., Stamper, T., Stokes, R., Brzyski, J., Hardiman, N., Klooster, M., & Merritt, B. (2013). *An Efficient Technique for Primer Development and Application that Integrates Fluorescent Labeling and Multiplex PCR. Applications in Plant Science*, Recuperado el 19 de mayo de 2019, de <https://doi.org/10.3732/apps.1300027>
- Deschepper, C. (2001). *M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods*. *BioTechniques*.
- Dossett, M., Bassil, N. V., Lewers, K. S., & Finn, C. E. (2012). *Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (Rubus occidentalis L.) evaluated by simple sequence repeat markers*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Recuperado el 13 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9808-8>
- Dotor, M., Gonzalés, L., Castro, M., Morillo, A., & Morillo, Y. (2016). ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA MORA (*Rubus spp.*) EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Recuperado el 17 de mayo de 2019, de <https://doi.org/10.18684/bsaa>
- Duarte, D., Chacón, M. I., Núñez, V., & Barrero, L. S. (2011). *Preliminary assessment of AFLP fingerprinting of Rubus glaucus Benth. elite genotypes* Evaluación preliminar de la huella genómica de genotipos élite. *Agronomía Colombiana*.
- Espinosa, N., Ligarreto, G. ., Barrero, L. ., & Medina, C. . (2016). Variabilidad morfológica de variedades nativas de mora (*Rubus sp.*) en los Andes de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*.

Recuperado el 26 de abril de 2019, de <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.4755>

- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detectando el número de grupos de individuos que utilizan el software *STRUCTURE*: un estudio de simulación. *Ecología Molecular*.
- Excoffier, L.; Smouse, Pe; Quattro, J. (1992). "Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data". *Genetics*.
- Fernández, F., Antanaviciute, L., Govan, C. L., & Sargent, D. J. (2011). Development of a multiplexed microsatellite set for fingerprinting red raspberry (*Rubus idaeus*) germplasm and its transferability to other *Rubus* species. *Journal of Berry Research*. Recuperado el 24 de junio del 2019, de <https://doi.org/10.3233/JBR-2011-019>
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (2000). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. *Embrapa*. Brasilia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). FAOSTAT Cultivos. Recuperado el 7 de mayo de 2019, de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Franco, T., & Hidalgo, R. (Eds.). (2003). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos (No.8). Cali: IPGRI.
- Galarza, D., Garcés, S., Velásquez, J., Sánchez, V., & Zambrano, J. (2016). EL CULTIVO DE MORA EN EL ECUADOR. Quito: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Graham, J., Smith, K., MacKenzie, K., Jorgenson, L., Hackett, C., & Powell, W. (2004). The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. Recuperado el 12 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1687-8>
- Hernández-Bautista, A., Lobato-Ortiz, R., García-Zavala, J. J., Rocandio-Rodríguez, M., Mejía-Contreras, J. A., Chávez-Servia, J. L., & García-Velazquez, J. A. (2018). Relationship of parental genetic

distance with agronomic performance, specific combining ability, and predicted breeding values of raspberry families. Euphytica. Recuperado el 4 de julio de 2019, de <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2122-6>

- INEC. (2000). Censo Nacional Agropecuario. (Instituto Nacional De Estadísticas y Censos, Ed.). Quito.
- IPGRI. (2007). Cultivos Andinos FAO. Recuperado el 8 de enero de 2019, de http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/cap01.htm
- Jacome, R., Ayala, G., Martínez, A., Viteri, P., Vásquez, W., & Sotomayor, A. (2016). Caracterización del sistema de producción, zonas de producción y tipificación de productores del Ecuador. In D. Galarza, S. Garcés, J. Velásquez, V. Sánchez, & J. Zambrano (Eds.), *El cultivo de Mora en el Ecuador*. Quito: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Karp, G. (2009). *Biología Celular y Molecular, Conceptos y experimentos* (quinta). México: McGRAW-HILL interamericana Editors.
- Khanuja, S; Shasany, A; Darokar, M; Kumar, S. (1999). *Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites Essential Oils. Plants Molecular Biology Reporter.*
- Kyung, J. L., Gi An, L., Hee Kyung, K., Jung Ro, L., Raveendar, S., Myoung-Jae, S., ... Kyung Ho, M. (2016). *Genetic Diversity and Population Structure of Rubus accesions using Simple Sequence Repeat Markers. Plant Breeding and Biotechnology, 62(1), 38–47.*
- Lai, K., Lorenc, M. T., & Edwards, D. (2015). *Plant Genotyping Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1245). Recuperado el 4 de febrero de 2019, de https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_4
- Lee, G. A., Song, J. Y., Choi, H. R., Chung, J. W., Jeon, Y. A., Lee, J. R., ... Lee, M. C. (2015). *Novel microsatellite markers acquired from Rubus coreanus miq. and cross-amplification in other Rubus species. Molecules.* Recuperado de 2 de febrero de 2019, de

<https://doi.org/10.3390/molecules20046432>

- LI-COR Biociencias. (2004). *Automated Microsatellite Analysis*. Nebraska.
- Linné, C. von, & Salvius, L. (1753). *Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas...* Holmiae : Impensis Laurentii Salvii,. Recuperado el 20 de febrero de 2019, de <https://www.biodiversitylibrary.org/item/13829>
- Liu, K., & Muse, S. V. (2005). *PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis*. *Bioinformatics*, 21(9), 2128–2129.
- Martinez, A., & Beltrán, O. (2007). Manual del cultivo de la mora de castilla (*Rubus glaucus B.*). INIAP (1ra ed.). Ambato.
- Martínez, A., Vásquez, W., Viteri, P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). (*Rubus glaucus Benth*) INIAP ANDIMORA-2013 INIAP - Estación Experimental Santa Catalina. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP, Programa Nacional de Fruticultura*, 1–14.
- Marulanda, M., & Lopez, A. (2009). *Characterization of Thornless Rubus glaucus in Colombia*. *Canadian Journal of Pure & Applied Sciences*, 3(3), 875–885.
- Marulanda, M., López, A., & Aguilar, S. (2007). *Genetic diversity of wild and cultivated Rubus species in Colombia using AFLP and SSR markers*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7(3), 242–252.
- Marulanda, M., López, A. M., & Uribe, M. (2012). *Molecular characterization of the Andean blackberry, Rubus glaucus, using SSR markers*. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 11(1), 322–331. Recuperado el 19 de abril de 2019, de <https://doi.org/10.4238/2012.February.10.3>
- Miyashita, T., Kunitake, H., Yotsukura, N., & Hoshino, Y. (2015). *Assessment of genetic relationships among cultivated and wild Rubus accessions using AFLP markers*. *Scientia Horticulturae*,. Recuperado el 5 de abril de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.004>
- Moreno, B. L., & Oyola, Y. A. D. (2016). Caracterización de parámetros

- fisicoquímicos en frutos de mora (*Rubus alpinus* Macfad). *Acta Agronomica*. Recuperado el 19 de abril de 2019, de <https://doi.org/10.15446/acag.v65n2.45587>
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). MANUAL Biología Molecular INIAP. Recuperado el 22 de mayo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.09.078>
- Neilan, B., Wilton, A., & Jacobs, D. (1997). *A universal procedure for primer labelling of amplicons*. *Nucleic Acids Res.*
- Park, S. (2000). *User's manual, Microsatellite ToolKit for MS Excel 97 or 2000 (PC)*. (Smurfit Institute of Genetics, Ed.). Dublin, Ireland.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update*. *Bioinformatics*.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. (2006). *DARwin software*. Recuperado el 5 de junio de 2019, de <http://darwin.cirad.fr/Darwin>
- Prah, J. (n.d.). MURVA Morus Nigra, Servicio Forestal Esloveno. Recuperado el 27 de abril de 2019, de <http://www.grad-sevnica.com/murva-morus-nigra.html>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*.
- Rodríguez Bautista, G., Segura Ledesma, S. D., Cruz Izquierdo, S., Corona Torres, T., López Medina, J., Gutierrez Espinoza, M. A., ... Valenzuela Núñez, L. M. (2018). Poliploidía en zarzamoras silvestres (*Rubus spp* L.). *Nova Scientia*. Recuperado el 9 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1385>
- Rodríguez, M. (2016). Evaluación de la variabilidad genética en cinco especies de mora (*Rubus spp*) mediante marcadores microsatélites SSR. Quito. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de <http://192.188.53.14/handle/23000/5695>
- Rohlf, F. J. (2009). *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (Applied Bi).
- Romoleroux, K. (1996). *Flora of Ecuador. Department of Systematic Botany,*

- (Vol. 1er ed.). Estocolmo, Noruega.
- Ryu, J., Ha, B.-K., Kim, D. S., Kim, J.-B., Kim, S. H., Ahn, J.-W., ... Kang, S.-Y. (2014). *Genetic diversity and variation analysis of mutant lines derived from γ -ray and chemical mutagen treatments in blackberry (*Rubus fruticosus*)*. *Plant Genetic Resources*. Recuperado el 3 de abril de 2019, de <https://doi.org/10.1017/S1479262114000537>
- Ryu, J., Kim, W. J., Im, J., Kim, S. H., Lee, K. S., Jo, H. J., ... Ha, B. K. (2018). *Genotyping-by-sequencing based single nucleotide polymorphisms enabled Kompetitive Allele Specific PCR marker development in mutant *Rubus* genotypes*. *Electronic Journal of Biotechnology*. Recuperado el 18 de marzo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.08.001>
- Sánchez, J., Villares, M., Niño, Z., & Maria, B. (2018). *Rubus glaucus benth* en la región interandina del Ecuador, 209–215.
- Szymanowska, U., Baraniak, B., & Bogucka-Kocka, A. (2018). *Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Postulated Cytotoxic Activity of Phenolic and Anthocyanin-Rich Fractions from Polana Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Fruit and Juice-In Vitro Study*. *Molecules (Basel, Switzerland)*. Recuperado el 8 de mayo de 2019, de <https://doi.org/10.3390/molecules23071812>
- USDA. (2003). *Plants Profile for *Rubus glaucus* (Andes berry)*. Recuperado el 8 de enero de 2019, de <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=RUGL5>
- Valentinuzzi, F., Pii, Y., Mimmo, T., Savini, G., Curzel, S., & Cesco, S. (2018). *Fertilization strategies as a tool to modify the organoleptic properties of raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits*. *Scientia Horticulturae*. Recuperado el 24 de mayo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.024>
- Velasco, R. (2014). Principios de las técnicas moleculares basadas en PCR. *Universidad Nacional Sede Palmira*.
- Villardón, V. (2015). *MULTBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots*. (D. de E. U. de Salamanca., Ed.).

- Vujović, T., Ružić, Đ., Cerović, R., Leposavić, A., Karaklajić-Stajić, Ž., Mitrović, O., & Žurawicz, E. (2017). *An assessment of the genetic integrity of micropropagated raspberry and blackberry plants*. *Scientia Horticulturae*. Recuperado el 5 de mayo de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.020>
- Vujović, T., Ruzic, D., Cerović, R., Leposavić, A., Žaklina, K.-S., Mitrović, O., & Žurawicz, E. (2017). *An assessment of the genetic integrity of micropropagated raspberry and blackberry plants*. *Scientia Horticulturae* (Vol. 225). Recuperado el 14 de junio de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.020>
- Wang, Q., Cobine, P. A., & Coleman, J. J. (2018). *Efficient genome editing in Fusarium oxysporum based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes*. *Fungal Genetics and Biology*. Recuperado el 1 de febrero de 2019, de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.003>

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la colecta de muestras y la codificación especificada para el laboratorio

MUESTREO INICIAL					
CÓDIGO	Altitud	Latitud	Longitud	Localidad	Provincia
ss1	3206	02°34,9' 07"	78° 57,0' 24"	Chorocopte	Cañar
ss2	3207	02°34,9' 07"	78° 57,0' 24"	Chorocopte	Cañar
ss3	3447	02°35,2' 80"	78° 57,1' 44"	Chorocopte los Encalada	Cañar
ss4	3457	02°37,7' 55"	78° 54,5' 81"	Cungapiti	Cañar
ss5	3458	02°37,7' 55"	78° 54,5' 81"	Cungapiti	Cañar
ss6	2750	03° 0.18' 49"	78° 44,6' 93"	Guavisay	Azuay
ss7	2750	03° 0.18' 49"	78° 44,6' 93"	Guavisay	Azuay
ss8	3000	03° 0.18' 49"	78° 44,6' 93"	Guavisay	Azuay
ss9	3000	03° 0.18' 49"	78° 44,6' 93"	Guavisay	Azuay
ss10	3200	03° 0.18' 51"	78° 44,6' 70"	Guavisay	Azuay
ss11	3100	03° 0.18' 45"	78° 44,6' 57"	Principal	Azuay
ss12	3100	03° 0.18' 45"	78° 44,6' 57"	Principal	Azuay
ss13	3128	03 13 06	78° 58'31"	Payacorrall	Azuay
ss14	3129	4 13 06	79° 58'31"	Payacorrall	Azuay
ss15	3218	2 13.9 51	77° 56,6'65"	Payacorrall	Azuay
ss16	3219	03 13.9 51	78° 56,6' 65"	Payacorrall	Azuay
ss17	3149	747765	78° 54,5' 81"	Curin alto	Azuay
ss18	3149	747732	78° 54,5' 81"	Curin alto	Azuay
ss19	3457	02°37,7' 55"	78° 54,5' 81"	Curin alto	Azuay
ss20	3458	02°37,7' 55"	78° 54,5' 81"	Curin alto	Azuay
ss21	2750	727787	9648457	Chanin	Azuay
ss22	2750	727787	9648457	Chanin	Azuay
ss23	3000	2 71 49,58	78 72 61,54	Chanin	Azuay
ss24	3000	3 71 49,58	79 72 61,54	Chanin	Azuay
ss25	3084	03°12' 56"	78° 58,1'79"	Chanin	Azuay
ss26	3084	03°12' 56"	78° 58,1'79"	Chanin	Azuay
ss27	3126	03°12,8' 49	78° 58,2' 89"	Chanin	Azuay
ss28	3128	03°13,0' 06"	78° 58,3' 31"	Payacorrall	Azuay
ss29	3128	03°13,0' 06"	78° 58,3' 31"	Payacorrall	Azuay
ss30	3028	03°12,2' 43"	78° 57,3' 49"	Payacorrall	Azuay
S31	3028	03°12,2' 43"	78° 57,3' 49"	Payacorrall	Azuay
S32	3219	03°13,9' 51"	78° 56,6' 65"	Payacorrall	Azuay

S33	3293	03°14,7' 93"	78° 55,7' 70"	Payacorrall	Azuay
S34	3293	03°14,7' 93"	78° 55,7' 70"	Payacorrall	Azuay
S35	3200	03°14,7' 90"	78° 55,7' 69"	Pucashapa	Azuay
S36	2900	03°14,6' 89"	78° 54,7' 58"	Pucashapa	Azuay
S37	3120	03° 16' 46"	79°39'17"	Pucara	Azuay
S38	3090	03° 16' 45"	79° 39'15"	Guno	Azuay
S39	2800	03° 16'63"	76°49,7'64"	la paz	Azuay
S40	3130	03° 16' 46"	79° 49' 19"	la paz	Azuay
S41	2840	03°39' 15"	79° 14' 58"	la paz	Azuay
S42	2840	03°39' 15"	79° 14' 58"	la paz	Azuay
S43	2840	03°39' 10"	79° 15' 7"	Pucara	Azuay
S44	2840	03°39' 10"	79° 15' 7"	Pucara	Azuay
S45	3070	03°33' 5"	79° 10' 44"	Saraguro lagunas alto	Loja
S46	3071	03°33' 5"	79° 10' 44"	Saraguro lagunas alto	Loja
S47	3351	04°42' 41,62"	79° 26' 26,30"	Saraguro lagunas	Loja
S48	3351	04°42' 41,62"	79° 26' 26,30"	Carboncillo	Loja
S49	3351	04°42' 41,62"	79° 26' 26,30"	Carboncillo	Loja
S50	3351	04°42' 41,62"	79° 26' 26,30"	Jimbura	Loja
S51	3351	04°42' 41,62"	79° 26' 26,30"	Jimbura	Loja
S52	3337	04°44' 58,17"	79° 25' 12,93"	Jimbura	Loja
S53	3337	04°44' 58,17"	79° 25' 12,93"	Jimbura	Loja
S54	3337	04°44' 58,17"	79° 25' 12,93"	Jimbura	Loja
S55	3337	04°44' 58,17"	79° 25' 12,93"	Jimbura	Loja
S56	3337	04°44' 58,17"	79° 25' 12,93"	Jimbura	Loja
S58	3458	03° 0.18 '51"	78° 58'31"	Jima (moriré)	Azuay

Anexo 2. Información disponible de las muestras del banco de ADN del INIAP.

Código	Especie	Altitud (msnm)	Latitud	Longitud	Localidad	Provincia
ma1	<i>Rubus glaucus Benth</i>				Ambato	Tungurahua
ma2	<i>Rubus glaucus Benth</i>				Ambato	Tungurahua
ma3	<i>Rubus glaucus Benth</i>				Ambato	Tungurahua
r1	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3000	1°24'243"	78°36'942"	Mocha	Tungurahua
r2	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3000	1°24'243"	78°36'942"	Mocha	Tungurahua
r3	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3000	1°20'346"	78°40'588"	Tisaleo	Tungurahua

r4	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3000	1°20'346"	78°40'588"	Tisaleo	Tungurahua
r5		3000	1°20'346"	78°40'588"	Tisaleo	Tungurahua
r6	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3000	1°20'346"	78°40'588"	Tisaleo	Tungurahua
r9	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2850	1°22'229"	78°36'552"	Cevallos	Tungurahua
r10	<i>Rubus spp.</i>	2400	1°14'604"	78°30'972"	Patate	Tungurahua
r11	<i>Rubus spp.</i>	2300	1°51'198"	78°30'906"	Patate	Tungurahua
r12	<i>Rubus spp.</i>	1310	1°24'956"	78°12'954"	Baños	Tungurahua
r13	<i>Rubus spp.</i>	1310	1°24'956"	78°12'954"	Baños	Tungurahua
r14	<i>Rubus urticifolious Poir</i>	1310	1°24'956"	78°12'954"	Baños	Tungurahua
r15	<i>Rubus niveus Thomb</i>	1320	1°24'956"	78°12'954"	Baños	Tungurahua
r16	<i>Rubus spp.</i>	4200	1°24'958"	78°12'808"	Baños	Tungurahua
r17	<i>Rubus urticifolious Poir</i>	4200	1°24'906"	78°14'099"	Baños	Tungurahua
r18	<i>Rubus spp.</i>	4200	1°24'906"	78°14'099"	Baños	Tungurahua
r19	<i>Rubus spp.</i>	1930	1°24'431"	78°14'350"	Baños	Tungurahua
r20	<i>Rubus niveus Thomb</i>	1930	1°24'431"	78°14'350"	Baños	Tungurahua
r22	<i>Rubus niveus Thomb</i>	2576			San Simon	Bolivar
r24	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2350	1°53'785"	79°04'038"	Chillanes	Bolivar
r25	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2351	1°53'785"	79°04'038"	Chillanes	Bolivar
r27	<i>Rubus roseous Poir</i>	3300	0°59'123"	79°58'797"		Cotopaxi
r30	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2150			El corazón	Cotopaxi
r32	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2150			El corazón	Cotopaxi
r35	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2200			El corazón	Cotopaxi
r36	<i>Rubus spp.</i>	2200			El corazón	Cotopaxi
r38	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3200			Ambato	Tungurahua
r39	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3200			Ambato	Tungurahua
r42	<i>Rubus spp.</i>	2280	1°18'493"	78°30'780"	Patate	Tungurahua
r43	<i>Rubus spp.</i>	2280			Patate	Tungurahua
r45	<i>Rubus glaucus Benth</i>	3160			Tisaleo	Tungurahua
r48	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2384			Tumbaco	Pichincha
r49	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2384			Tumbaco	Pichincha
r51	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2400	1°59'40"	79°08'039"	Chillanes	Bolivar
r52	<i>Rubus spp.</i>	2400	1°59'40"	79°08'039"	Chillanes	Bolivar
r53	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2340			Chillanes	Bolivar
r54	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2340			Chillanes	Bolivar
r56	<i>Rubus glaucus</i>	2400			Chillanes	Bolivar

	<i>Benth</i>					
r57	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2450			Chillanes	Bolivar
r58	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2450			Chillanes	Bolivar
r59	<i>Rubus spp.</i>	2400			Chillanes	Bolivar
r60	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2200			Chillanes	Bolivar
r61	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2200			Chillanes	Bolivar
r62	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2200			Chillanes	Bolivar
r63	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2200			Chillanes	Bolivar
r64	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3200			Ambato	Tungurahua
r67	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3200			Ambato	Tungurahua
r68	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3200			Ambato	Tungurahua
r69	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3160			Ambato	Tungurahua
r70	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3160			Ambato	Tungurahua
r71	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3160			Ambato	Tungurahua
r72	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	3000	1°24'24"	78°36'942"	Mocha	Tungurahua
r73	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r74	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r75	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r76	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r77	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r78	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r79	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r81	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r83	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r84	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r85	<i>Rubus glaucus</i> <i>Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r86	<i>Rubus glaucus</i>	2348			Tumbaco	Pichincha

	<i>Benth</i>					
r87	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r88	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r89	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r90	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r91	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r92	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r93	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r94	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r95	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r96	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha
r97	<i>Rubus glaucus Benth</i>	2348			Tumbaco	Pichincha

Anexo 3. Resultados de la cuantificación de las muestras recolectadas.

Muestra	260/280	ng/uL	10ng/uL
ss1	1,165	3756,73	0,3
ss2	1,404	2452,82	0,4
ss3	1,918	412,2	2,4
ss4	1,112	3795,92	0,3
ss5	1,95	1025,55	1
ss6	2,016	502,9	2
ss7	1,974	605,6	1,7
ss8	2,02	686,7	1,5
ss9	2,09	1881,9	0,5
ss10	2,049	953,3	1
ss11	1,059	2954,79	0,3
ss12	2,096	1663,7	0,6
ss13	2,034	1160,5	0,9
ss14	2,049	844,8	1,2
ss15	1,96	2246,19	0,4
ss16	1,96	2246,19	0,4
ss17	1,249	3827,17	0,3
ss18	1,842	472,84	2,1
ss19	1,971	327,7	3,1
ss20	2,02	395,3	2,5
ss21	1,895	3489,32	0,3
ss22	1,995	1637,01	0,6

ss23	2,105	3386,11	0,3
ss24	2,047	1157,35	0,9
ss25	1,084	3393,11	0,3
ss26	1,787	3406,79	0,3
ss27	1,581	3837,11	0,3
ss28	1,158	3837,11	0,3
ss29	1,11	3204,4	0,3
ss30	2,019	3293,5	0,3
ss31	2,132	2813,14	0,3
ss32	2,006	3193,3	0,3
ss33	1,882	448,7	2,2
ss34	1,903	322,1	3,1
ss35	2,102	2817,7	0,4
ss36	2,083	2687,8	0,4
ss37	1,979	583,8	1,7
ss38	1,91	2881,5	0,3
ss39	2,093	2804,54	0,4
ss40	1,812	3538,6	0,3
ss41	1,425	3844,26	0,3
ss42	2,035	426,096	2,3
ss43	2,2	1810,27	0,6
ss44	2,183	2047,25	0,5
ss45	2,182	1646,28	0,6
ss46	1,971	598,131	1,7
ss47	2,04	698,9	1,4
ss48	1,964	425,4	2,4
ss49	2,108	1903,88	0,5
ss50	2,04	1097,17	0,9
ss51	2,157	1738,08	0,6
ss52	2,151	2261,93	0,4
ss53	1,8	186,904	5,4
ss54	1,759	205,103	4,9
ss55	1,888	207,4	4,8
ss56	2,097	1424,15	0,7
ss57	1,891	281,6	3,6

Anexo 4. Resultados de la cuantificación de las muestras del Banco genético del INIAP.

Muestra	260/280	ng/ μ L	10ng/uL	Validadas
r1	1,73	188,268	5,3	Si
r2	1,505	3,874	258,1	Si
r3	1,412	3,282	304,7	Si

r4	1,82	509,936	2,0	Si
r5	2,129	1187,133	0,8	Si
r6	1,823	667,875	1,5	Si
r9	2,175	1578,169	0,6	Si
r10	2,168	1269,541	0,8	Si
r21	15,455	36,948	27,1	No
r22	2,111	888,156	1,1	Si
r23	4,053	66,855	15,0	No
r24	2,098	1798,772	0,6	Si
r25	2,024	224,466	4,5	Si
r27	1,971	813,521	1,2	Si
r28	1,391	3,422	292,2	No
r30	1,327	599,089	1,7	Si
r31	0,644	3,174	315,1	No
r32	1,389	483,484	2,1	Si
r33	1,8	5,921	168,9	No
r34	2,045	656,077	1,5	No
r35	1,322	3065,741	0,3	Si
r36	1,521	1777,655	0,6	Si
r38	1,768	1056,183	0,9	Si
r39	2,024	1005,603	1,0	Si
r40	1,76	9,551	104,7	No
r42	1,68	1202,433	0,8	Si
r43	1,631	3244,979	0,3	Si
r45	2,224	1703,571	0,6	Si
r48	1,95	3449,626	0,3	Si
r49	2,066	3446,336	0,3	Si
r50	1,858	1080,158	0,9	No
r51	2,166	41,648	24,0	Si
r52	2,137	2343,695	0,4	Si
r53	1,891	741,577	1,3	Si
r54	1,468	204,167	4,9	Si
r56	1,873	1375,249	0,7	Si
r57	1,995	850,908	1,2	Si
r58	1,589	484,213	2,1	Si
r59	1,177	2853,075	0,4	Si
r60	1,753	1088,991	0,9	Si
r61	1,76	191,448	5,2	Si
r62	1,665	3823,981	0,3	Si
r63	2,145	686,785	1,5	Si
r64	1,522	3265,839	0,3	Si
r66	1,446	11,444	87,4	No
r67	2,168	347,897	2,9	Si
r68	1,99	2661,778	0,4	Si
r69	2,106	320,254	3,1	Si
r70	2,192	3002,961	0,3	Si

r71	2,077	1152,756	0,9	Si
r72	1,198	3274,01	0,3	Si
r73	1,861	3224,774	0,3	Si
r74	1,296	3677,461	0,3	Si
r75	1,606	2369,589	0,4	Si
r76	1,111	3566,421	0,3	Si
r77	1,892	339,215	2,9	Si
r78	1,795	3721,119	0,3	Si
r79	2,105	2973,547	0,3	Si
r80	1,111	3432,513	0,3	No
r81	1,602	1792,173	0,6	Si
r82	1,575	160,096	6,2	No
r83	1,7	807,033	1,2	Si
r84	2,045	3059,107	0,3	Si
r85	1,287	3391,874	0,3	Si
r86	1,793	3805,702	0,3	Si
r87	1,358	3287,359	0,3	Si
r88	1,111	3662,437	0,3	Si
r89	1,758	1008,501	1,0	Si
r90	1,31	810,259	1,2	Si
r91	1,57	2548,78	0,4	Si
r92	1,115	3603,43	0,3	Si
r93	1,499	1213,832	0,8	Si
r94	1,907	3495,681	0,3	Si
r95	1,714	2977,248	0,3	Si
r96	1,133	3613,69	0,3	Si
r97	1,203	3706,31	0,3	Si
r98	1,159	1065,265	0,9	No
ma1	2,278	648,571	1,5	Si
ma2	2,181	1004,378	1,0	Si
ma3	2,245	777,142	1,3	Si

Anexo 6. Resultados de Índice Q de similitud, análisis de estructura para todas las muestras. En color rojo se ven las muestras de G1, y de color azul las muestras de G2.

No.	MUESTRAS	G1	G2	No.	MUESTRAS	G1	G2
1	ma1	0,999	0,001	35	r51	0,999	0,001
2	ma2	0,999	0,001	36	r52	0,997	0,003
3	ma3	0,999	0,001	37	r53	0,999	0,001
4	rp1	0,998	0,002	38	r54	0,999	0,001
5	r10	0,959	0,041	39	r56	0,995	0,005
10	r15	0,994	0,006	40	r57	0,999	0,001
15	r2	0,998	0,002	41	r58	0,997	0,003
16	r20	0,997	0,003	44	r60	0,999	0,001
17	r22	0,998	0,002	45	r61	0,999	0,001
18	r24	0,999	0,001	46	r62	0,999	0,001
19	r25	0,999	0,001	47	r63	0,999	0,001
21	r3	0,998	0,002	48	r64	0,999	0,001
22	r30	0,999	0,001	49	r67	0,999	0,001
23	r32	0,999	0,001	50	r68	0,999	0,001
24	r35	0,997	0,003	51	r69	0,999	0,001
26	r38	0,999	0,001	52	r70	0,999	0,001
27	r39	0,999	0,001	53	r71	0,999	0,001
28	r4	0,999	0,001	54	r72	0,999	0,001
29	r42	0,997	0,003	55	r73	0,999	0,001
31	r45	0,999	0,001	56	r74	0,999	0,001
32	r48	0,999	0,001	57	r75	0,999	0,001
33	r49	0,999	0,001	58	r76	0,999	0,001
34	r5	0,96	0,04	59	r77	0,999	0,001
78	r97	0,999	0,001	13	r18	0,001	0,999
112	ss4	0,887	0,113	14	r19	0,013	0,987
7	r12	0,003	0,997	20	r27	0,041	0,959
8	r13	0,081	0,919	80	ss10	0,002	0,998
9	r14	0,003	0,997	81	ss11	0,001	0,999
11	r16	0,101	0,899	82	ss12	0,001	0,999
12	r17	0,005	0,995	83	ss13	0,001	0,999
84	ss14	0,003	0,997	86	ss16	0,001	0,999
85	ss15	0,01	0,99	87	ss17	0,004	0,996
88	ss18	0,002	0,998	108	ss36	0,007	0,993
89	ss19	0,005	0,995	109	ss37	0,003	0,997
91	ss20	0,002	0,998	110	ss38	0,014	0,986

92	ss21	0,006	0,994	111	ss39	0,002	0,998
93	ss22	0,003	0,997	113	ss40	0,009	0,991
94	ss23	0,002	0,998	114	ss41	0,003	0,997
95	ss24	0,001	0,999	115	ss42	0,002	0,998
96	ss25	0,066	0,934	116	ss43	0,003	0,997
97	ss26	0,002	0,998	117	ss44	0,002	0,998
98	ss27	0,01	0,99	118	ss45	0,002	0,998
99	ss28	0,024	0,976	119	ss46	0,001	0,999
100	ss29	0,01	0,99	120	ss47	0,002	0,998
102	ss30	0,002	0,998	121	ss48	0,141	0,859
103	ss31	0,002	0,998	122	ss49	0,003	0,997
104	ss32	0,001	0,999	124	ss50	0,002	0,998
105	ss33	0,003	0,997	125	ss51	0,001	0,999
106	ss34	0,005	0,995	126	ss52	0,002	0,998
107	ss35	0,003	0,997				

Anexo 7. Resultados de Índice Q de similitud, análisis de estructura para las muestras del grupo 1 (G1).

#	MUESTRAS	SP1	SP2	#	MUESTRAS	SP1	SP2
1	ma1	0,999	0,001	31	r64	0,999	0,001
2	ma2	0,999	0,001	32	r67	0,999	0,001
3	ma3	0,999	0,001	33	r68	0,999	0,001
4	rp1	0,998	0,002	34	r69	0,999	0,001
5	r15	0,006	0,994	35	r70	0,999	0,001
6	r2	0,998	0,002	36	r71	0,999	0,001
7	r20	0,003	0,997	37	r72	0,999	0,001
8	r24	0,999	0,001	38	r73	0,999	0,001
9	r25	0,999	0,001	39	r74	0,999	0,001
10	r3	0,998	0,002	40	r75	0,999	0,001
11	r30	0,999	0,001	41	r76	0,999	0,001
12	r32	0,999	0,001	42	r77	0,999	0,001
13	r35	0,997	0,003	43	r78	0,998	0,002
14	r38	0,999	0,001	44	r79	0,999	0,001
15	r39	0,999	0,001	45	r81	0,998	0,002
16	r42	0,003	0,997	46	r83	0,999	0,001
17	r45	0,999	0,001	47	r84	0,999	0,001
18	r48	0,999	0,001	48	r85	0,998	0,002
19	r49	0,999	0,001	49	r86	0,998	0,002
20	r4	0,96	0,04	50	r87	0,999	0,001

21	r52	0,003	0,997	51	r88	0,998	0,002
22	r53	0,999	0,001	52	r89	0,999	0,001
23	r54	0,999	0,001	53	r9	0,998	0,002
24	r56	0,995	0,005	54	r90	0,999	0,001
25	r57	0,999	0,001	55	r91	0,998	0,002
26	r58	0,997	0,003	56	r92	0,999	0,001
27	r60	0,999	0,001	57	r93	0,999	0,001
28	r61	0,999	0,001	58	r94	0,999	0,001
29	r62	0,999	0,001	59	r95	0,999	0,001
30	r63	0,999	0,001	60	ss4	0,887	0,113
61	r4	0,998	0,002				

