



Diversidad genética de *Rubus glaucus* Benth en el municipio de Pamplona (nororiente de Colombia).

Genetic diversity of Rubus glaucus Benth in the municipality of Pamplona (northeastern Colombia).

Daniel Araque-Castellanos^a; Giovanni Cancino-Escalante^a; Diego Alexander Hernández-Contreras^b; Danny Chinchilla-Cardenas^c

^aUniversidad de Pamplona, Colombia.

^bUniversidad de Cundinamarca, Colombia.

^cMascolab S.A.S., Colombia.

Correspondencia: daniel.araquec@unipamplona.edu.co

Recibido: Diciembre 3, 2021. Aceptado: Diciembre 10, 2021. Publicado: Diciembre 21, 2021

Resumen

En Colombia, el área del cultivo de *R. glaucus* Benth, ha aumentado desde el 2000, al presentar características organolépticas y económicas de gran atractivo para el comercio nacional e internacional. La mejora de la oferta de este producto en el país, en un contexto de cambio climático, dependerá de la implementación de nuevas técnicas de propagación por parte de los agricultores y el uso de genotipos superiores, con alta diversidad y libres de patógenos. En este trabajo se seleccionaron 7 Secuencias Simples Repetidas (SSR) polimórficos, para caracterizar la diversidad en la huella genética en 92 individuos de *R. glaucus* en 23 fincas de Pamplona (Noreste de los Andes de Colombia). La extracción del ADN se realizó empleando el *kit Invisorb® Spin plant*. Se amplificaron mediante PCR los microsatélites G01, R47a, R123a, R167h, R228a y R285a, y se revelaron en gel de poliacrilamida al 12%. El índice de similitud de DICE, análisis de variación molecular (AMOVA) y análisis de correspondencia múltiple (ACM), informaron que la población de mora evaluada presenta moderada a alta diversidad genética (67% por la variación de los individuos dentro de las fincas y en un 33% entre las fincas). Los valores promedio del contenido de información polimórfica PIC = 0.302 y heterogeneidad esperada $H_e = 0.388$, indican que los SSR son adecuados para realizar futuras investigaciones en esta especie. Este trabajo contribuye con nuevos datos al conocimiento de la diversidad genética en cultivos de *R. glaucus*, que pueden apoyar las estrategias de propagación y conservación de mora de castilla en Colombia.

Palabras clave: AMOVA; diversidad genética; mora; PCR; PIC.

Abstract

In Colombia, the area of *R. glaucus* Benth cultivation has increased since 2000, as it has organoleptic and economic characteristics of great attractiveness for national and international trade. The improvement of the supply of this product in the country, in a context of climate change, will depend on the implementation of new propagation techniques by farmers and the use of superior genotypes, with high diversity and free of pathogens. In this work, 7 polymorphic Simple Sequence Repeats (SSR) were selected to characterize the genetic fingerprint diversity in 92 individuals of *R. glaucus* in 23 farms of Pamplona (Northeastern Andes of Colombia). DNA extraction was performed using the *Invisorb® Spin plant kit*. Microsatellites G01, R47a, R123a, R167h, R228a and R285a were amplified by PCR and revealed in 12% polyacrylamide gel. The DICE similarity index, analysis of molecular variation (AMOVA) and multiple correspondence analysis (MCA) reported that the blackberry population evaluated shows moderate to high genetic diversity (67% due to variation of individuals within farms and 33% between farms). The average values of polymorphic information content PIC = 0.302 and expected heterogeneity $H_e = 0.388$ indicate that the SSRs are suitable for future research on this specie. This work contributes with new data to the knowledge of genetic diversity in crops of *R. glaucus*, which can support propagation and conservation strategies of blackberry in Colombia.

Keywords: AMOVA; blackberry; genetic diversity; PCR; PIC.

1. Introducción

El género *Rubus* tiene entre 700 y 750 especies de distribución cosmopolita, exceptuando la Antártida [1, 2]. Los Andes colombianos, representan por sus características altitudinales, climáticas y ecológicas un hábitat natural para especies del género *Rubus* [3], de tal manera que el Instituto de Ciencias Naturales [3] ha reportado 24 especies habitando en esta región. Se estima que esta diversidad de especies y

variedades, se debe a que el género *Rubus* es heterocigoto con un amplio nivel de ploidía [4], y según Graham y Woodhead [4] es “diploide $2x=2n=14$ hasta dodecaploide $12x=2n=84$ ”. Se ha demostrado que estos niveles de ploidía ocurren por la hibridación entre especies, considerándose como aloploide [5, 7] y además *R. glaucus* es alotetraploide ($4x=2n=28$) [8, 9].

Los individuos de *Rubus sp.* cultivados con poca frecuencia son multiplicados de forma sexual (semilla), por

su bajo porcentaje de germinación, lento desarrollo de las plantas, presencia de variabilidad y problemas de esterilidad [10]. Como solución a estos inconvenientes que reducen la productividad del cultivo, en Colombia se ha optado por usar la multiplicación vegetativa con diferentes técnicas de propagación por injertos (microinjertos) o acodado, esquejes o cultivos *in vitro* [11]. La propagación asexual, puede presentar problemas por poca disponibilidad de material y limitaciones fitosanitarias, por lo que el cultivo de tejidos vegetales (micropropagación) cobra protagonismo ya que permite obtener un alto número de plantas bajo condiciones de laboratorio a partir de yemas axilares o meristemas apicales [12, 13]; con esta técnica se garantiza calidad genética y fitosanitaria de las plantas [12, 13]. Marmolejo [14] reportó por primera vez en Colombia la producción de mora de Castilla por apomixis. Por estas razones, la micropropagación es una herramienta agrícola relevante para emplearla en la obtención de organismos clonales en programas de fitomejoramiento, pero esta técnica disminuye la diversidad genética de los cultivos [12].

En el género *Rubus* se ha pretendido mejorar ciertas características del cultivo como: el sabor, la textura, manejo mecánico del cultivo, rendimiento neto, resistencia a diferentes plagas o enfermedades, y en mejorar las condiciones de almacenamiento, entre otros [15, 17]. El método de reproducción en los agroecosistemas es un aspecto técnico de suma importancia, pero a menudo suele descuidarse, aumentando la homocigosidad y, por lo tanto, muchos aspectos de la biología de las plantas, como los niveles y patrones de diversidad genética o la evolución del genoma a largo plazo [18]. Lo anterior, podría resultar en la pérdida de la diversidad genética que limitaría las opciones de fitomejoramiento en los cultivos, ya que sería menos probable encontrar genes que ofrezcan un mayor rendimiento productivo, con tolerancia ante factores estresores bióticos y abióticos [19]. El análisis del estado de la diversidad genética en los cultivos comerciales en los últimos 30 años ha requerido del desarrollo y uso de marcadores moleculares que han proporcionado conocimientos específicos sobre su diversidad y estructura genética [20, 22].

En el género *Rubus*, la implementación de los microsatélites se ha concentrado principalmente en *R. ideaeus* [23, 24] desarrollando cebadores que permitieron la implementación de este tipo de tecnología en *R. glaucus* de Colombia [25, 27]. El estudio de *R. glaucus* y *R. urticifolius*, tanto silvestre como cultivado, facilitó caracterizar algunos aspectos biológicos importantes, como: diferenciar los genotipos recolectados, según su lugar de procedencia (a nivel departamental), su nivel de flujo genético, y en aquellos casos con individuos con un porcentaje de similaridad de 100%, estos marcadores permiten identificar cuáles de estos individuos se han propagado clonalmente [28, 29].

En el nororiente colombiano, se han realizado pocos trabajos con enfoque en biología molecular en la mora de Castilla. No obstante, algunos autores mediante el uso de caracteres morfológicos cuantitativos, caracterizaron individuos silvestres y de origen comercial de *Rubus sp.* que

se produce en Chitagá y Pamplona [30]. Cancino-Escalante *et al.* [12] establecieron condiciones apropiadas para la propagación *in vitro* de microplántulas de mora, usando medios enriquecidos con fitohormonas de este trabajo se benefició la comunidad agrícola de Pamplona ya que se les proporcionaron materiales seleccionados de *R. glaucus* [12]. En 2012 Cancino-Escalante *et al.* [31] informaron mediante el análisis de marcadores AFLPs alta diversidad genética de los genotipos silvestres evaluados de *R. glaucus*.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad genética en plantas de *R. glaucus* provenientes de Pamplona, municipio ubicado en el noreste de los Andes de Colombia, mediante el análisis de marcadores moleculares microsatélites (SSR).

2. Métodos

2.1 Material vegetal

Se recolectaron hojas juveniles y en buen estado fitosanitario [32] de 92 individuos de *R. glaucus* Tab. 1, en Pamplona, Norte de Santander (Colombia), presentes en cuatro de las principales veredas productoras de mora del municipio (navarro, sabaneta alta, sabaneta baja y jurado), en los meses de enero y febrero del 2019. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta que se extrajo el ADN.

2.2 Extracción de ADN

Se maceraron 60 mg de tejido vegetal juvenil con nitrógeno líquido y se empleó el kit de extracción Invisorb® Spin Plant [33]. Para evaluar la calidad y cantidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.9% (p/v) con SafeView™ a 90 voltios por 40 minutos (con marcador de peso molecular de 1kb). se visualizó el gel en transiluminador UV, luego se cuantificó el ADN en espectrofotómetro NanoDrop™.

2.3 Amplificación de los microsatélites

Las condiciones de amplificación se modificaron de aquellas establecidas por Cusba [25], empleando las siguientes concentraciones de reactivos, para un volumen final por reacción de 15 μl : 50ng de ADN genómico, 1X buffer GDSBio, 0.4mM dNTPs, 0.4 μM primers Tab. 2, 1.5 mM MgCl_2 , 6 μg de BSA (Bovine Serum Albumin) y 1.8 U ExcelTaq™ Taq Pol de SMOBIO®. En el termociclador se empleó la siguiente programación: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 45 ciclos compuestos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos; y se terminó con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los amplificados fueron sometidos a electroforesis en poliacrilamida al 12% a 60 voltios/3 horas, se realizó la tinción con SYBR® Green, y se visualizó mediante transiluminador UV, midiendo las bandas en ImageJ [34].

Tabla 1. Muestras recolectadas de *R. glaucus* Benth (mora de Castilla), código, localidad, altitud y coordenadas geográficas.

Código muestra	Localidad	Altitud (m.s.n.m.)	Coordenadas Geográficas
1 - 4	El peñoncito, Vereda Navarro	2822	7°22.878 N - 72°40.747 W
5 - 8	Sopla viento, Vereda Navarro	2820	7°22.266 N - 72°40.323 W
9 - 12	La Lomita, Vereda Navarro	2604	7°22.116 N - 72°40.344 W
13 - 16	El Porvenir, Vereda Sabaneta Baja	2142	7°24.921 N - 72°39.995 W
17 - 20	San Antonio, Vereda Sabaneta Baja	2123	7°24.850 N - 72°40.111 W
21 - 24	El Palomar, Vereda Jurado	2542	7°37.288 N - 72°66.189 W
25 - 28	El Palomar II, Vereda Jurado	2250	7°37.362 N - 72°66.258 W
29 - 32	Finca 8, Vereda Jurado	2438	7°44.172 N - 72°68.768 W
33 - 36	Finca 9, Vereda Jurado	2399	7°44.312 N - 72°68.546 W
37 - 40	El Salao, Vereda Jurado	2223	7°44.543 N - 72°67.867 W
41 - 44	El Salao II, Vereda Jurado	2223	7°44.543 N - 72°67.867 W
45 - 48	El Pino, Vereda Jurado	2276	7°44.399 N - 72°68.243 W
49 - 52	San Isidro II, Vereda Sabaneta Baja	2339	7°40.437 N - 72°66.035 W
53 - 56	La Esmeralda, Vereda Sabaneta Baja	2374	7°40.644 N - 72°65.990 W
57 - 60	Corral de Piedra, Vereda Sabaneta Baja	2310	7°41.182 N - 72°66.122 W
61 - 64	Parte Borrero, Vereda Sabaneta Baja	2226	7°41.420 N - 72°66.449 W
65 - 68	Las Brisas, Vereda Sabaneta Baja	2193	7°41.688 N - 72°66.504 W
69 - 72	Santa Rosa, Vereda Sabaneta Baja	2202	7°40.703 N - 72°66.917 W
73 - 76	El Aliso, Vereda Sabaneta Alta	2730	7°39.228 N - 72°71.753 W
77 - 80	Los Alpes, Vereda Sabaneta Alta	2715	7°39.144 N - 72°71.855 W
81 - 84	Casa Vieja, Vereda Sabaneta Alta	2622	7°38.527 N - 72°71.663 W
85 - 88	Campo Hermoso, Vereda Sabaneta Alta	2610	7°38.409 N - 72°71.651 W
89 - 92	Campo Alegre, Vereda Sabaneta Alta	2622	7°38.429 N - 72°71.616 W

Tabla 2. Secuencias y estructura de los microsatélites utilizados en esta investigación, de acuerdo con Cusba [25].

SSR	Secuencia	Estructura
R251a	F: GCATCAGCCATTGAATTTCC R: CCCACCTCCATTACCAACTC	(GA)10
R47a	F: AAGCAGGACACCTCAGATGC R: CAGCCAACCATCATCAGCTA	(CT)7(TA)7
R123a	F: CAGCAGCTAGCATTTTACTGG R: GCACTCTCCACCCATTTTCAT	(AG)8
R167a	F: AACCCCTAAGCCAAGGACCAT R: CACCACCATGACAGTCAGA	(TC)9
R228a	F: TGGACAGCTTTGTGCAGAGT R: GCTTGCTGTATCTCCATTGC	(GA)41
R285a	F: TCGAGAAGCTTGCTATGCTG R: GGATACCTCAATGGCTTTCTTG	(TC)9
G01	F: CCCTCCATCTCCACCATAAAA R: GTAAGGCCACCCATTGAG	(GAGA)19

2.4 Diversidad genética

Los patrones electroforéticos fueron transformados en una matriz de presencia (1) y ausencia (0) para ser analizados como marcadores “dominantes”, de acuerdo con la metodología propuesta por Zilli [35]. En NTSYS-pc v. 2.2 [36] se calculó el coeficiente de DICE [37], análisis de conglomerados (usando el método UPGMA) y análisis de correspondencia múltiple (ACM); en este análisis se consideró la relación con la altura. En GenAlEx v. 6.503 [38] se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) con 999 permutaciones y $P \leq 0,001$. En PowerMarker 3.25 [39] se calcularon los valores del contenido de información polimórfica (PIC), de acuerdo como informan Botstein et al. [40] y De Riek et al. [41], al estimar un rango de “valores menores a 0.15 como no informativos, valores entre 0.15 y 0.25 como informativos y mayores a 0.25 como altamente informativos” y la heterocigicidad esperada (H_e) [42].

3. Resultados

3.1 Amplificación de los marcadores

La cantidad de alelos por microsatélite estuvo entre 3 y 7 bandas de diferentes tamaños Tab. 3. Algunos de los individuos llegaron a presentar hasta 3 alelos cada uno. Específicamente el microsatélite, R123a presentó los valores más altos de H_e (0.438) y PIC (0.334), seguido por R285a con H_e de 0.437 y PIC de 0.332. El marcador G01 obtuvo los valores más bajos con 0.281 de H_e y 0.231 de PIC.

Tabla 3. Valores de los patrones alélicos y parámetros de diversidad por microsatélite.

SSR	Número de Alelos	Rango de Peso (pb)	H_e	PIC
G01	7	222-287	0.281	0.231
R47a	5	241-288	0.390	0.306
R123a	5	202-242	0.438	0.334
R167h	6	155-206	0.373	0.295
R228a	3	126-151	0.416	0.323
R251a	5	157-200	0.383	0.296
R285a	5	155-200	0.437	0.332
Promedio	5		0.388	0.302

3.2 Flujo genético

3.2.1 Distancias Genéticas y Dendograma

El dendograma Fig. 1. construido con el índice de similaridad de DICE [37] generó agrupaciones con un coeficiente menor a 0.21, conformado por los individuos 83, 84, 74 y 67. El grupo 2, se origina en el coeficiente de 0.25, y está integrado por 12 individuos de la vereda Sabaneta Alta y 17 de Sabaneta Baja. El grupo 3, ubicado después del coeficiente de referencia 0.37, presenta varios subgrupos que aumentan su similitud después del coeficiente de 0.68, esta agrupación muestra las similitudes entre 19 individuos de sabaneta baja, 28 de jurado y 12 de navarro; Esta agrupación no presenta intercambio de material genético con individuos de sabaneta

alta (individuos resaltados en amarillo). Por último, se encontraron agrupaciones con coeficiente DICE de 1 (39 con 41 y 20 con 21), que pueden considerarse como individuos de origen clonal.

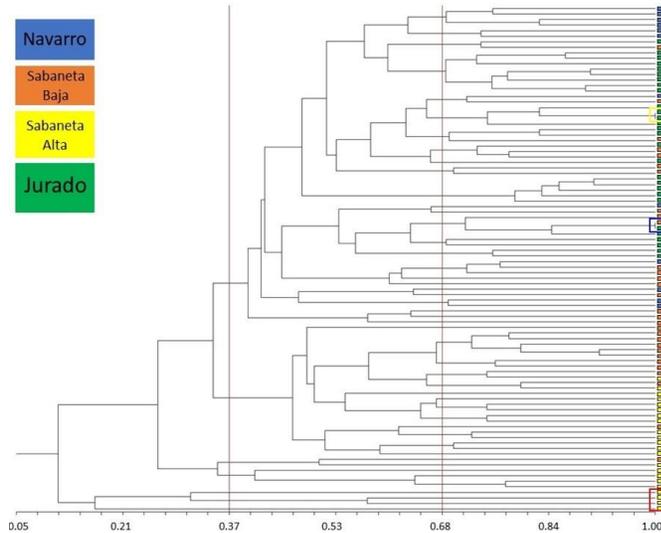


Figura 1. UPGMA con las distancias del índice de similitud de DICE [37]. Cuadro amarillo = individuos 39 y 41, cuadro azul= individuos 20 y 21, cuadro rojo= individuos 83, 84, 74 y 67.

3.2.2 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El AMOVA Tab. 5 mostró que la variación genética de *R. glaucus* en Pamplona, se explica con un 67% dentro de las fincas y 33% entre las fincas.

Tabla 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre y dentro de las 23 Fincas para 92 Individuos de *R. glaucus* usando 7 microsatélites.

Fuente de variación	Desviación estándar	Porcentaje de variación
Entre las Fincas	2.357	33%
Dentro de las fincas	4.837	67%
Total	7.194	100%

3.2.3 Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM)

El ACM Fig. 2 mostró la conformación de dos agrupaciones generales: El grupo 1, solo tiene individuos de las veredas Sabaneta Baja y Alta. El grupo 2, se subdivide en subgrupos A y B, ya que están presentes individuos de todas las veredas. Algunos individuos (74, 89 y 81) se encuentran ampliamente distanciados de las agrupaciones denotando un alto grado de diferenciación respecto al resto de individuos. No se evidenció agrupamiento específico de los individuos respecto a la altitud de las fincas.

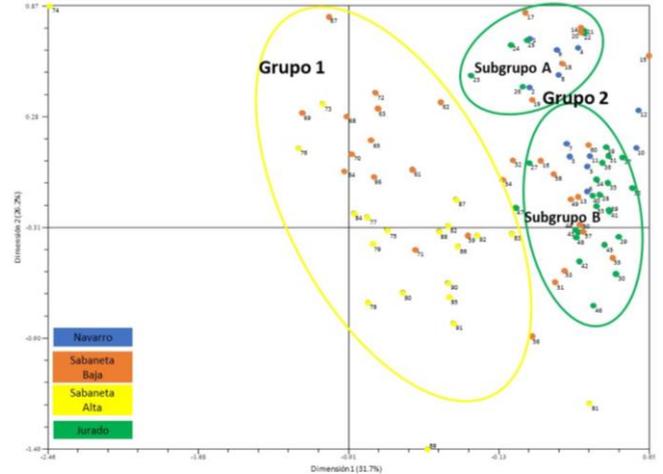


Figura 2. ACM de los 92 individuos de *R. glaucus*.

4. Discusión

El análisis de agrupamiento mediante el índice de similitud de DICE [37], muestra entre los coeficientes 0.25 y 0.37 diferencia entre el grupo de sabaneta alta, frente al grupo no diferenciado compuesto por individuos de jurado, navarro y sabaneta baja. Es posible que el flujo génico de las otras veredas hacia la vereda sabaneta alta o viceversa, sea limitado o no evidente. Estos coeficientes fueron similares a los obtenidos por Marulanda y López [43] y Cancino-Escalante et al. [31], con la particularidad que en ambos trabajos se emplearon grupos taxonómicos diferentes, mientras que en el presente estudio los individuos eran de la misma especie. Estos valores de coeficiente DICE generalmente se han asociado a una alta diversidad genética poblacional [44, 45], concordando con los coeficientes al interior de los grupos de 0.68 y 0.9, que son similares con los valores reportados por López et al. de 0.63 a 0.89 [46], pero con una diferencia importante, ya que estos autores recolectaron individuos de 7 departamentos cuyas distancias permitieron diferenciar la procedencia geográfica, indicando que la diversidad genética de las muestras de Pamplona no estaría por debajo de los resultados interdepartamentales.

La presencia de individuos agrupados con un coeficiente de 1, puede indicar el tipo de propagación del material [47, 48], siendo de preferencia para los agricultores de mora en Pamplona la multiplicación por estacas, dado que permite obtener clones, aunque en menor cantidad que aquellos obtenidos por micropropagación, y con la posibilidad técnica de realizarlo por ellos mismos en sus fincas [49]. En esta región, anteriores experiencias han proporcionado a los agricultores plantas micropropagadas de mora [12], que en su momento proporcionaron homogeneidad en la producción, lo que indirectamente puede ser un generador de nuevos ingresos a los agricultores, como se ha logrado en cultivos de arándanos [50] y plátano [52]. No obstante, este sistema de propagación, puede causar la reducción de la diversidad genética, al producir “nuevas” plantas con la misma información genética de la planta “madre” [53].

La representación espacial en el ACM, corroboró las relaciones del dendograma, que se soportan en el AMOVA. La formación de 2 grupos, muestra un escenario asociado a prácticas culturales de los agricultores (venta de plantas), con material vegetal que se comparte entre jurado, navarro y sabaneta baja, pero no con sabaneta alta. Este tipo de intercambio cultural puede alterar la variación genética intrapoblacional, como se ha reportado en *Elaeis guineensis* [54]. En el ACM con datos de cinco marcadores moleculares RAM en *Calycolpus mortizianus*, conformó dos grupos de individuos heterogéneos entre localidades que evidencian la presencia de flujo génico [32], lo que es similar, en una escala ecológica menor al patrón observado entre individuos de mora de jurado, navarro y sabaneta baja. Los resultados de este trabajo indican que esta población no tiene diferenciación acorde a la altitud de las muestras, lo que representa una mayor probabilidad de intercambio genético entre individuos, dada su proximidad geográfica, o porque de manera natural la polinización, el intercambio de semillas o plántulas entre los agricultores estimulan el flujo génico [55].

En relación con el bajo porcentaje de diferenciación entre las fincas (33%), el aislamiento no es evidente entre las fincas, ni entre las veredas, al menos en la mayoría de los individuos (incluyendo los de sabaneta alta). Lo anterior, es debido a la diversidad de los individuos y porque el origen o procedencia del material vegetal en ocasiones proviene de otros departamentos como Cundinamarca y Santander, según reportaron los agricultores en entrevista personal. En otros cultivos como melón y trigo [56, 57] se presentaron resultados similares, donde predomina la diferenciación de los individuos dentro de las localidades, lo cual se atribuye a distintos factores como los sistemas de producción, el flujo de genes, la selección de rasgos morfoagronómicos útiles para la propagación de variedades superiores o la diversidad producto del cruzamiento entre especies [56, 57]. Estas dinámicas propias de cualquier agroecosistema pueden influir en la no estructuración observada entre las fincas de mora evaluadas, lo cual es similar a los reportes de Marulanda et al. [58] y Dotor [48], quienes sugieren la posibilidad que este porcentaje diferencial entre fincas, es aprovechable en programas de mejoramiento genético y para diseñar estrategias de conservación de individuos silvestres o cultivados que tienen alta diversidad genética y potencial productivo como lo proponen Hernández-Contreras et al. [32] y Getahun [59].

La heterocigicidad esperada (H_e) promedio fue de 0.388, superando lo obtenido por Marulanda et al. [58] de 0.279, posiblemente porque ellos amplificaron 3 microsatélites, junto con un número reducido de individuos (27) y con el trabajo de Dotor et al. [48] que tras analizar 21 ecotipos de *Rubus* spp. mediante microsatélites amplificados al azar (RAM) obtuvieron de H_e promedio de 0.29, concluyendo que la diversidad genética de la zona de estudio era baja y sugieren la necesidad de generar planes de manejo para incrementar la diversidad, sin sacrificar los materiales adaptados a la región previamente establecidos. En el lulo, Coronado et al. [60], estimaron una H_e de 0.36, este valor se

lo atribuyen a la naturaleza alógama de la especie, como ocurre con *R. glaucus* [27] Marulanda et al. [27] y Castillo et al. [29] obtuvieron una H_e de 0.456 y de 0.61, respectivamente, superando el valor obtenido en el presente estudio, los cambios en las condiciones de muestreo junto con el tipo de marcador empleado pudieron incidir en las diferencias presentadas entre los trabajos mencionados [61].

Los marcadores que son evaluados como dominantes, cuentan con un rango de contenido de información polimórfica (PIC) que va desde 0 a 0.5, siendo este último valor, el mayor grado de detección de polimorfismo entre dos genotipos tomados al azar [62]. Al comparar los valores obtenidos en este trabajo con los rangos propuestos por Botstein et al. [40] y De Riek [41], y empleados en trabajos prácticos como el caso del “membrillo cimarrón” [63], se observó que todos los microsatélites empleados son como mínimo “informativos” ya que G01 fue el marcador que presentó menor PIC=0.23, pero R167h, R251a, R47a, R228a, R285a y R123a superaron el rango inferior (0.25) para catalogarlos como “altamente informativos”. Además, estos 3 últimos microsatélites pueden ser seleccionados como los “mejores”, si se tiene en cuenta que también presentaron los más altos valores de H_e con: 0.416, 0.437 y 0.438, respectivamente, como los más informativos para ser considerados en futuros trabajos sobre genética de poblaciones de *R. glaucus*.

Al comparar nuestros resultados con los otros trabajos como: Cekic et al. [64], en promedio obtuvieron menor PIC (0.25) con el marcador dominante “Inter Secuencias Simples Repetidas” (ISSR), en 19 genotipos de *R. idaeus* de la costa del mar negro en Turquía, y Sedighi y Rahimmalek [65] detectaron un PIC promedio (0.434) superior al de este trabajo (0.302) tras analizar 250 individuos de 25 poblaciones procedentes de diferentes regiones de Irán. Estos resultados en otras especies indican que un muestreo más amplio de *R. glaucus* en el nororiente colombiano, puede modificar la estimación de la diversidad genética, y un mayor muestreo en la provincia de Pamplona permitiría detectar mayor diversidad alélica y de PIC.

5. Conclusiones

Este trabajo, corroboró la utilidad de siete microsatélites en la descripción de la diversidad genética de *R. glaucus*. Los individuos evaluados tienen huellas genéticas diferentes, con diversidad genética moderada-alta, que es mayor dentro de las fincas. La transferencia de material vegetal entre estas puede aumentar la diversidad entre las fincas a mediano plazo, y la venta de plantas entre agricultores de Pamplona, junto con la obtención de material vegetal foráneo garantizaría la no homogenización del material vegetal a largo plazo. Se sugiere a los agricultores potenciar esta práctica seleccionando plantas con características superiores.

Reconocimientos

A la Universidad de Pamplona y a Mascolab que permitieron la realización de esta investigación. A los agricultores de mora de Pamplona por aportar las muestras. A Orlando Lizarazo (Alcaldía de Pamplona) por la logística en las salidas de campo. A Diana N. Duque-Gamboa (Universidad de Cundinamarca), por su orientación en el uso de algunos programas.

Referencias

- [1] D. Potter *et al.*, “Phylogeny and classification of Rosaceae”, *Plant Systematics and Evolution*, 2007, vol. 266, no. 1–2. doi: 10.1007/s00606-007-0539-9.
- [2] J. Y. Huang y J. M. Hu, “Revision of *Rubus* (Rosaceae) in Taiwan”, *Taiwania*, vol. 54, no. 4. 2009. doi: 10.6165/tai.2009.54(4).285.
- [3] Instituto de Ciencias Naturales, “Colección - herbario”, 2021. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/result/genus/Rubus/plants/>
- [4] J. Graham y M. Woodhead, “Raspberries and blackberries: the genomics of *Rubus*”. *Genetics and Genomics of Rosaceae*, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-77491-6_24.
- [5] M. Mimura, M. Mishima, M. Lascoux, y T. Yahara, “Range shift and introgression of the rear and leading populations in two ecologically distinct *Rubus* species”, *BMC Evolutionary Biology*, vol. 14, no. 1, p. 209, 2014, doi: 10.1186/s12862-014-0209-9.
- [6] Y. Wang *et al.*, “Phylogenetic insight into subgenera *Idaeobatus* and *Malachobatus* (*Rubus*, Rosaceae) inferring from ISH analysis”, *Molecular Cytogenetics*, vol. 8, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s13039-015-0114-y.
- [7] Q. Chen, Y. Wang, H. Nan, L. Zhang, H. Tang, y X. Wang, “Meiotic configuration and rDNA distribution patterns in six *Rubus* taxa”, *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, vol. 75, no. 2, 2015, doi: 10.5958/0975-6906.2015.00037.1.
- [8] K. Arnes Carter, “Phylogenetic estimation and ancestral state reconstruction of *Rubus* (Rosaceae) using target capture sequencing”, Oregon State University, 2018.
- [9] A. M. López Gutiérrez, M. L. Marulanda Ángel, L. M. Gómez López, y C. F. Barrera Sánchez, “*Rubus glaucus* Benth.: Morphology and floral biology aimed at plant breeding processes”, *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, vol. 72, no. 3, 2019, doi: 10.15446/rfnam.v72n1.75910.
- [10] G. Franco y M. J. Giraldo, “El cultivo de la mora.”, p. 83, 2001.
- [11] R. Orozco-Rodríguez, D. Flores-Mora, y F. Argüello-Delgado, “Efecto de diferentes tipos de propagación en el rendimiento de mora vino (*Rubus adenotrichus*)”, *Agronomía Mesoamericana*, vol. 22. Scielo, pp. 91–97, 2011.
- [12] G. O. Cancino-Escalante, E. Q. García, C. E. Villamizar, y C. D. Carvajal, “Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia”, *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 17, no. 2, pp. 7–15, 2015, doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262.
- [13] J. Restrepo y R. Sánchez, “Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth) Medidas para la temporada invernal”, *Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)*, 2011, [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7343>
- [14] D. F. Marmolejo Cortes, “Evaluación de apomixis en germoplasma seleccionado de mora de Castilla *Rubus glaucus* Benth.” 2010. [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7343>
- [15] K. Antonius y H. Nybom, “Discrimination between sexual recombination and apomixis in a *Rubus* Plant Breeding Programme”, *Hereditas*, vol. 123, no. 3, 1995, doi: 10.1111/j.1601-5223.1995.00205.x.
- [16] K. Antonius-Klemola, “Molecular markers in *Rubus* (Rosaceae) research and breeding”, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 74, no. 2, pp. 149–160, Jan. 1999, doi: 10.1080/14620316.1999.11511088.
- [17] T. M. Foster, N. V. Bassil, M. Dossett, M. Leigh Worthington, y J. Graham, “Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future”, *Horticulture Research*, vol. 6, no. 1, p. 116, 2019, doi: 10.1038/s41438-019-0199-2.
- [18] D. Charlesworth, “Evolution of plant breeding systems”, *Current Biology*, vol. 16, no. 17, pp. R726–R735, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.068>.
- [19] S. Swarup, E. J. Cargill, K. Crosby, L. Fligel, J. Kniskern, y K. C. Glenn, “Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops”, *Crop Science*, vol. 61, no. 2. 2021. doi: 10.1002/csc2.20377.
- [20] Y. Xu, *Molecular Plant Breeding*. CABI, 2010.
- [21] Y.-B. Fu, “Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 128, no. 11, pp. 2131–2142, 2015, doi: 10.1007/s00122-015-2585-y.
- [22] M. A. Nadeem *et al.*, “DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 32, no. 2, pp. 261–285, Mar. 2018, doi: 10.1080/13102818.2017.1400401.
- [23] J. Graham, K. Smith, M. Woodhead, y J. Russell, “Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species”, *Molecular Ecology Notes*, vol. 2, no. 3. 2002. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00203.x.
- [24] J. Graham, K. Smith, K. MacKenzie, L. Jorgenson, C. Hackett, y W. Powell, “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*, vol. 109, no. 4, 2004, doi: 10.1007/s00122-004-1687-8.
- [25] M. L. Cusba, “Contribución al estudio de la huella genómica de genotipos élite de mora (*Rubus glaucus* Benth.) mediante marcadores SSRs.” Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia, 2011.
- [26] M. L. Marulanda, A. M. López, y M. Uribe, “Genetic diversity and transferability of *Rubus* microsatellite markers to South American *Rubus* Species”, *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, 2012. doi: 10.5772/32838.
- [27] M. L. Marulanda, A. M. López, y M. Uribe, “Molecular characterization of the Andean blackberry, *Rubus glaucus*, using SSR markers.”, *Genetics and molecular research: GMR*, vol. 11, no. 1, pp. 322–331, 2012, doi: 10.4238/2012.February.10.3.
- [28] N. R. Castillo, N. V. Bassil, S. Wada, y B. M. Reed, “Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 46, no. 3, pp. 246–256, 2010, doi: 10.1007/s11627-009-9265-z.
- [29] N. R. Castillo, B. M. Reed, J. Graham, F. Fernández-Fernández, y N. V. Bassil, “Microsatellite markers for raspberry and blackberry”, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 135, no. 3, pp. 271–278, May 2010.
- [30] G. O. Cancino-Escalante, L. R. Sánchez-Montaño, E. Quevedo-García, y C. Díaz-Carvajal, “Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia”, *Universitas Scientiarum*, vol. 16, no. 3, pp. 219–233, Nov. 2011.
- [31] G. O. Cancino-Escalante, D. S. Barbosa Hernández, y C. D. Carvajal, “Diversidad genética de especies silvestres y cultivadas de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región nororiental de Colombia.”, *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 10, no. 1, 2012, doi: 10.24054/01204211.v1.n1.2012.51.
- [32] D. A. Hernández-Contreras, F. de Jesús Torres-Torres, M. Figueroa-Lozano, L. R. Sánchez-Montaño, A. M. Posso-Terranova, y J. E. Muñoz-Flórez, “Genetic structure and diversity

- of *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) in the north-eastern Andes of Colombia”, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 92, 2021, doi: 10.22201/IB.20078706E.2021.92.3635.
- [33] B. Pipan, M. Zupančič, E. Blatnik, P. Dolničar, and V. Meglič, “Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus X domestica*)”, *Cogent Food & Agriculture*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.1080/23311932.2018.1540094.
- [34] C. A. Schneider, W. S. Rasband, y K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”, *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, 2012, doi: 10.1038/nmeth.2089.
- [35] A. L. Zilli, “Ampliación de la base genética del germoplasma tetraploide sexual de *Paspalum notatum*: caracterización genética y reproductiva de una población sintética”, Universidad Nacional de Rosario, 2017.
- [36] F. J. Rohlf, Inc. Applied Biostatistics, y E. S. (Firm), “NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system.”, Applied Biostatistics, Inc.: Exeter Software, Setauket, N.Y., 2009.
- [37] M. Nei, “Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals”, *Genetics*, vol. 89, no. 3, 1978, doi: 10.1093/genetics/89.3.583.
- [38] R. Peakall y P. E. Smouse, “GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update.”, *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 28, no. 19, pp. 2537–2539, Oct. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- [39] K. Liu y S. V. Muse, “PowerMaker: an integrated analysis environment for genetic maker analysis”, *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, 2005, doi: 10.1093/bioinformatics/bti282.
- [40] D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, y R. W. Davis, “Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms”, *American Journal of Human Genetics*, vol. 32, no. 3, 1980, doi: 10.17348/era.9.0.151-162.
- [41] J. de Riek, E. Calsyn, I. Everaert, E. van Bockstaele, y M. de Loose, “AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties”, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 103, no. 8, 2001, doi: 10.1007/s001220100710.
- [42] M. Nei, “Analysis of gene diversity in subdivided populations”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 70, no. 12 (I), 1973, doi: 10.1073/pnas.70.12.3321.
- [43] M. L. Marulanda y A. M. Lopez, “Characterization of thornless *Rubus glaucus* in Colombia”, *Canadian Journal of Pure & Applied Sciences*, vol. 3, no. 3, 2009.
- [44] D. Fu *et al.*, “Phylogenetic relationships among five species of *Armeniaca* Scop. (Rosaceae) using microsatellites (SSRs) and capillary electrophoresis”, *Journal of Forestry Research*, vol. 27, no. 5, 2016, doi: 10.1007/s11676-016-0245-y.
- [45] R. Ouni *et al.*, “Genetic diversity and structure of tunisian local pear germplasm as revealed by SSR markers”, *Horticultural Plant Journal*, vol. 6, no. 2, pp. 61–70, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.03.003>.
- [46] A. M. López, C. F. Barrera, y M. L. Marulanda, “Evaluation of SSR and SNP markers in *Rubus glaucus* benth progenitors selection”, *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 41, no. 1, 2019, doi: 10.1590/0100-29452019081.
- [47] A. C. Morillo, Y. Morillo, J. E. Muñoz F., H. D. Vásquez A., y A. Zamorano, “Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp. de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira”, *Acta Agronómica*, vol. 54, no. 2, 2005.
- [48] M. Y. Dotor Robayo, L. A. González-Mendoza, M. A. Castro, A. C. Morillo Coronado, y Y. Morillo Coronado, “Análisis de la diversidad genética de la mora (*Rubus* spp.) en el departamento de Boyacá”, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 14, no. 2, 2016, doi: 10.18684/bsaa(14)10-17.
- [49] P. Viteri D. *et al.*, “Métodos de propagación y establecimiento del cultivo de mora”, *Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura*, p. cap. 4, pp. 61–76, 2016.
- [50] S. C. Debnath y U. Arigundam, “*In Vitro* Propagation Strategies of Medicinally Important Berry Crop, Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.)”, *Agronomy*, vol. 10, no. 5, 2020, doi: 10.3390/agronomy10050744.
- [51] A. M. Henao-Ramírez y A. I. Urrea-Trujillo, “Somatic embryogenesis for clonal propagation and associated molecular studies in cacao (*Theobroma cacao* L.) BT - Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery”, P. A. Chong, D. J. Newman, and D. A. Steinmacher, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 63–102, doi: 10.1007/978-3-030-51358-0_5.
- [52] P. Sivakumar y M. Visalakshi, “*In vitro* micropropagation of banana cv. Poovan (AAB)”, *Journal of Applied Horticulture*, vol. 23, no. 1, 2021, doi: 10.37855/jah.2021.v23i01.07.
- [53] N. P. Louwaars, “Plant breeding and diversity: a troubled relationship?”, *Euphytica*, vol. 214, no. 7, p. 114, 2018, doi: 10.1007/s10681-018-2192-5.
- [54] C. C. C. Cardona, Y. M. Coronado, A. C. M. Coronado, y I. Ochoa, “Genetic diversity in oil palm (*Elaeis guineensis* jacq) using RAM (random amplified microsatellites)”, *Bragantia*, vol. 77, no. 4, 2018, doi: 10.1590/1678-4499.2017385.
- [55] M. S. Andersson, R. Schultze-Kraft, M. Peters, M. C. Duque, y G. Gallego, “Extent and structure of genetic diversity in a collection of the tropical multipurpose shrub legume *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze as revealed by RAPD markers”, *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 10, scielocj, pp. 386–399, 2007, doi: 10.4067/S0717-34582007000300006.
- [56] S. G. Khoei, B. A. Mandoulakani, y I. Bernousi, “Genetic diversity in Iranian melon populations and hybrids assessed by IRAP and REMAP markers”, *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 17, no. 5, 2015.
- [57] D. Kumar *et al.*, “Characterization of genetic diversity and population structure in wheat using array based SNP markers”, *Molecular Biology Reports*, vol. 47, no. 1, pp. 293–306, 2020, doi: 10.1007/s11033-019-05132-8.
- [58] M. L. Marulanda, A. M. López, y S. B. Aguilar, “Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers”, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, vol. 7, no. 3, 2007, doi: 10.12702/1984-7033.v07n03a03.
- [59] T. Getahun *et al.*, “Molecular genetic diversity and population structure in Ethiopian chickpea germplasm accessions”, *Diversity*, vol. 13, no. 6, 2021, doi: 10.3390/d13060247.
- [60] A. C. M. Coronado, Y. P. Tovar-León, y Y. M. Coronado, “Characterization of lulo (*Solanum quitoense* Lam.) genetic diversity in the department of Boyaca, Colombia”, *Acta Agronomica*, vol. 66, no. 3, 2017, doi: 10.15446/acag.v66n3.58997.
- [61] H. Nybom, “Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants”, *Molecular Ecology*, vol. 13, no. 5, 2004, doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x.
- [62] Y. V. Chesnokov y A. M. Artemyeva, “Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity”, *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, vol. 50, no. 5, 2015, doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.571eng.
- [63] D. González-Cerritos, C. A. Núñez-Colín, E. Villordo-Pineda, G. Medina-Ramos, y M. M. González-Chavira, “Variabilidad genética del membrillo cimarrón (*Malacomeles denticulata* [Kunth] Jones) obtenida mediante marcadores Inter Secuencias Simples Repetidas o Intermicrosatélites (ISSR)”, *Acta Universitaria*, vol. 25, no. 4, 2015, doi: 10.15174/au.2015.773.
- [64] C. Cekic, O. Calis, y S. Ozturk Erdem, “Genetic diversity of wild raspberry genotypes (*Rubus idaeus* L.) in North Anatolia based on issr markers”, *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 16, no. 5, 2018, doi: 10.15666/aeer/1605_68356843.
- [65] E. Sedighi y M. Rahimmalek, “Evaluation of genetic diversity of *Rubus hyrcanus* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and morphological markers”, *Biologia (Poland)*, vol. 70, no. 3, 2015, doi: 10.1515/biolog-2015-0039.