



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 Hernandez-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 Simple 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 de 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 aporta nuevos datos al conocimiento de la diversidad genética en cultivos de *R. glaucus* de Colombia, y un conjunto de microsatélites que proporcionan información útil para implementar mejores estrategias de propagación vegetal de mora de castilla con apoyo de los agricultores de la región.

Palabras clave: mora; PCR; diversidad genética; AMOVA; 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 species. This work contributes new data to the knowledge of genetic diversity in cultivars of *R. glaucus* in Colombia, and a set of microsatellites that provide useful information to implement better strategies for plant propagation of blackberry with the support of farmers in the region.

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

1. Introducción

A nivel mundial, se estima que el género *Rubus* tiene entre 700 y 750 especies distribuidas en 12 subgéneros, por lo que se convierte en el género con mayor número de especies dentro de la familia *Rosaceae* además cuenta con amplia distribución a nivel global exceptuando la Antártida [1], [2]. Los Andes colombianos, representan por sus características

altitudinales, climáticas y ecológicas un hábitat natural para especies del género *Rubus*, de tal manera que según el [3] se han determinado 24 especies. Se estima que esta diversidad de especies y variedades, se deben a que el género *Rubus* es altamente heterocigoto con un amplio nivel de ploidía que va desde diploide $2x=2n=14$ hasta dodecaploide $12x=2n=84$ [4], se ha demostrado que estos diferentes niveles de ploidía se han dado a causa de hibridación o “mezcla” de diferentes

especies, siendo este un origen alopoloide [5]–[7], *R. glaucus* ha sido determinada como alotetraploide ($4x=2n=28$) debido a la unión de los genomas de dos especies [8], [9].

Los individuos de *Rubus sp* cultivados, con poca frecuencia son multiplicados de forma sexual (por semilla), ya que se presenta bajo porcentaje de germinación, lento desarrollo de las plantas, presencia de variabilidad y problemas de esterilidad [10]. Como solución a estos inconvenientes que pudieran reducir la productividad del cultivo, en Colombia se ha optado por multiplicar de manera asexual ya sea por divisiones de la corona, acodo aéreo, acodo subterráneo, estacas de tallo subterráneo o cultivo *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 un gran protagonismo ya que permite obtener un alto número de plantas bajo condiciones de laboratorio a partir de yemas vegetativas o meristemas apicales; con esta técnica se garantiza calidad genética y fitosanitaria de las plantas [12], [13]. Adicionalmente, Marmolejo [14] reportó por primera vez en Colombia la producción de mora de Castilla por apomixis, siendo este un método de propagación asexual que permite obtener plantas genéticamente idénticas a las plantas madre, sin estar limitada la disponibilidad de material (al producir semillas) y sin transmitir afectaciones fitosanitarias. Por estas razones, se considera como una herramienta relevante para ser empleada en programas de fitomejoramiento debido a su estabilidad pero a su vez, el alto grado de homocigocis disminuye directamente la diversidad genética de los cultivos.

En el género *Rubus* se han realizado esfuerzos investigativos continuos, buscando poder mejorar ciertas características del cultivo como: el sabor, la textura, manejo del cultivo mecánico, el rendimiento, resistencia a plagas – enfermedades, mejorar las propiedades de almacenamiento y procesamiento [15]–[17].

El método de reproducción de los ejemplares en los sistemas de cultivo representa un aspecto de suma importancia, pero que a menudo suelen ser descuidados, aumentando la homocigocidad y, por lo tanto, muchos aspectos de la biología de las plantas, como, por ejemplo: los niveles y patrones de diversidad genética y evolución del genoma [18]. Lo anterior, podría resultar en la pérdida de un recurso indispensable como la diversidad genética, que finalmente limitaría las opciones de fitomejoramiento en los cultivos, ya que sería menos probable encontrar individuos con genes que ofrezcan un mayor rendimiento productivo, tolerancia ante factores estresantes de tipo bióticos y abióticos [19]. Para analizar el estado de la diversidad genética en los cultivos en los últimos 30 años se han empleado y desarrollado marcadores moleculares que han proporcionado conocimientos más profundos sobre la diversidad disponible para los cultivos [20]–[22].

En el género *Rubus*, la implementación de los microsatélites se centró principalmente en *R. idaeus* [23], [24] desarrollando cebadores que permitieron la implementación de este tipo de marcador en Colombia [25]–[27] para el estudio de *R. glaucus* y *R. urticifolius* tanto silvestres como cultivados, estas caracterizaciones permitieron: diferenciar entre estas dos especies, su origen silvestre o cultivado, así como en *R. glaucus*, aunque no en todos los casos, se pudo diferenciar los individuos colectados dependiendo de su lugar de colecta (a nivel de departamentos), detectar la presencia de flujo génico y cuando se llegaron a presentar individuos con 100% de similaridad se evidencia la posibilidad de que con este marcador se puedan identificar plantas que han sido propagadas 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 cuantitativos, determinaron la existencia de poblaciones locales, silvestres, cultivadas y algunas introducciones de diversas especies de *Rubus sp* (entre estas *R. glaucus* con y sin espinas) [30]. Cancino-Escalante *et al.* [13] establecieron condiciones apropiadas para la propagación *in vitro* de microplántulas de mora, de este trabajo se benefició la comunidad agrícola de Pamplona ya que se les proporcionaron alrededor de 1000 individuos. En 2012 Cancino-Escalante *et al.* [31] informaron mediante el análisis del marcador AFLP una alta diversidad genética entre especies silvestres de *Rubus* y genotipos de *R. glaucus* provenientes de Pamplona y Chitagá.

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. Método

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 con el espectrofotómetro NanoDrop™ de Thermo Scientific™.

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

2.3 Amplificación de los microsatélites

Las condiciones de amplificación se modificaron de las de [25], dejando: el volumen final del “mix” por reacción de 15µl con 50ng de ADN genómico, 1X buffer GDSBio, 0.4mM dNTPs, 0.4 µM primers Tab. 2, 1.5 mM MgCl₂, 6 µg BSA (Bovine Serum Albumin) y 1.8 U ExcelTaq™ Taq Pol de SMOBIO®. En el termociclador se programó: 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 productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en poliacrilamida al 12% a 60 voltios por 3 horas, se realizó la tinción con SYBR® Green de Invitrogen™, y se visualizó mediante transiluminador UV, midiendo las bandas en ImageJ [34].

Tabla 2. Secuencias y estructura de los microsatélites.

SSR	Secuencia	Estructura
R251a	F: GCATCAGCCATTGAATTTCC R: CCCACCTCCATTACCAACTC	(GA)10
R47a	F: AAGCAGGACACCTCAGATGC R: CAGCCAACCATCATCAGCTA	(CT)7(TA)7
R123a	F: CAGCAGCTAGCATTTFACCTGGA R: GCACTCTCCACCCATTTCAT	(AG)8
R167a	F: AACCCCTAAGCCAAGGACCAT R: CACCACCCATGACAGTCAGA	(TC)9
R228a	F: TGGACAGCTTTGTGTCAGAGT R: GCTTGCTTGATCTCCATTGC	(GA)41
R285a	F: TCGAGAAGCTTGCTATGCTG R: GGATACCTCAATGGCTTCTTG	(TC)9
G01	F: CCCTCCATCTCCACCATAAA 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 [35]. En NTSYS-pc v. 2.2 [36] se generó el coeficiente de DICE [37], análisis de conglomerados usando el método UPGMA y análisis de correspondencia múltiple (ACM). 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), considerando 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; [40], [41] y la heterocigocidad 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 la 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 de 1 (39 con 41 y 20 con 21), pueden considerarse como individuos de origen clonal debido al valor de DICE.

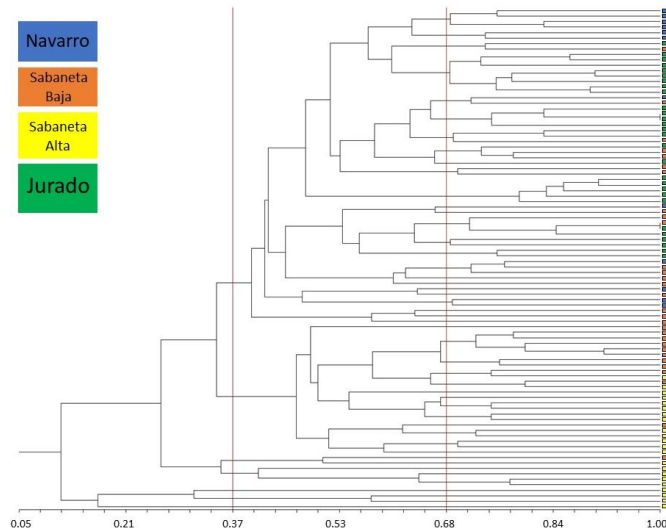


Figura 1. UPGMA con las distancias del índice de similaridad de DICE [37].

Fuente: Autores

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.

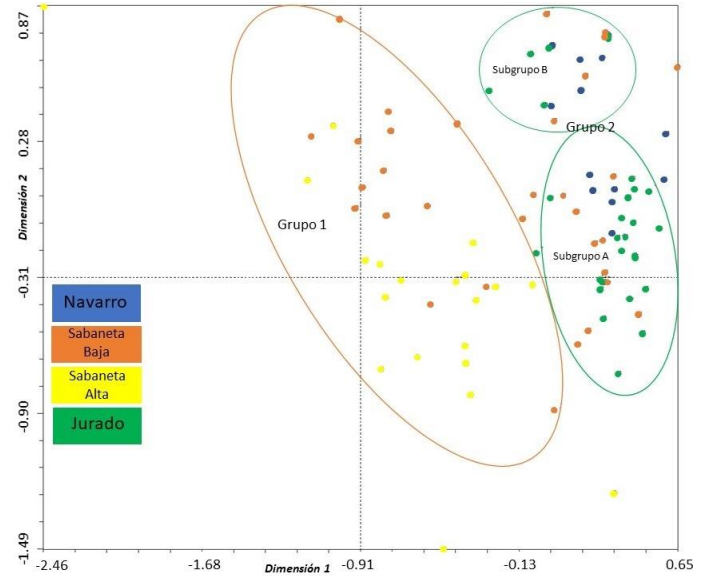


Figura 2. ACM de los 92 individuos de *R. glaucus*. Fuente: Autores

4. Discusión

El análisis de agrupamiento mediante la similaridad de DICE [37], se presentó entre los coeficientes 0.25 y 0.37 diferencia de los individuos entre un grupo delimitado por su ubicación (vereda Sabaneta Alta), frente al grupo sin delimitación con una “mezcla” entre las veredas Jurado, Navarro y Sabaneta Baja. Respectivamente, podría presentarse el caso en que no hay flujo génico de las otras veredas hacia la vereda Sabaneta Alta o viceversa. Estos coeficientes fueron similares a los obtenidos por [43] y [31] con la particularidad que en ambos trabajos se separaron individuos de grupos taxonómicos diferentes, mientras que el presente estudio los individuos eran de la misma especie, por lo que se puede considerar un sinónimo de alta diversidad genética [44], [45]. Lo que concuerda con los coeficientes al interior de los grupos de 0.68 y 0.9, comparables con los valores reportados por [46] de 0.63 a 0.89, pero con una diferencia significativa, ya que ellos recolectaron individuos de 7 diferentes departamentos cuyas distancias permitieron diferenciar la procedencia geográfica, lo que nos puede indicar 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 ser un indicativo del tipo de propagación del material [47], [48], siendo de preferencia por los agricultores la multiplicación por estacas, al permitir obtener clones, aunque en menor cantidad que los obtenidos por

micropropagación, pero con la posibilidad de realizarlo por ellos mismos en sus fincas [49]. Además, se proporcionaron alrededor de 1000 plantas micropropagadas a los agricultores locales [13], estas plantas pudieron proporcionar homogeneidad en la producción, que indirectamente pudo aumentar los ingresos de los agricultores, así como se ha logrado en otros cultivos [50]–[52]. Con estos ejemplos, se evidencia la utilidad e importancia de este sistema de propagación, pero que a su vez puede causar la reducción o pérdida de diversidad genética, al producir “nuevas” plantas con la misma información genética de la planta “madre” [53]. La representación espacial en el ACM, corrobora las relaciones mencionadas en el dendograma y que se soportan en el AMOVA. Ya que la separación de los datos en 2 grupos, puede sugerir diferenciación genética y la amplia distribución de los “puntos” del ACM sugiere alta variación genética principalmente a nivel intrapoblacional como ha sido reportado en *Elaeis guineensis* [54]. El ACM con datos de marcadores moleculares RAM en *Calycolpus mortizianus* [32], se conformaron grupos de individuos heterogéneos entre localidades que evidencian la presencia de flujo génico que es similar, en una escala ecológica menor, al patrón observado entre individuos de mora presentes en las veredas Jurado, Navarro y Sabaneta Baja. Adicionalmente, los resultados de este trabajo indican que en la población evaluada de *R. glaucus* no hay diferenciación acorde a la altitud en que fueron recolectadas las muestras, lo cual representa una probabilidad de mayor intercambio genético entre algunas veredas, dada su proximidad geográfica, o porque de manera natural la polinización o el intercambio de semillas o plántulas entre los agricultores estimula el flujo génico [55].

En relación con el bajo porcentaje de diferenciación entre las fincas (33%), podemos asumir que no se presenta aislamiento ni entre las fincas ni entre las veredas al menos en la mayoría de los individuos, dejando un poco de lado a los de Sabaneta Alta, ya que muy posiblemente que por su diversidad y separación con los demás individuos no deja que el porcentaje entre las fincas sea aún menor, adicionalmente, es posible que se deba también al origen o procedencia del material ya que como comentaron algunos de los agricultores en ocasiones han accedido a material proveniente de otros departamentos (Cundinamarca y Santander). En otros cultivos como melón, césped, o trigo [56]–[58] se presentaron resultados similares, donde predomina la diferenciación de los individuos dentro de las localidades, esto puede ser atribuido a distintos factores como el sistema de producción, flujo de genes, selección de rasgos morfoagronomicamente importantes o la diversidad producto de la unión de especies. Con lo anterior, podemos inferir que no hay una estructuración definida entre las fincas, similar a los observado por [59] y [48] quienes además sugiere la posibilidad, de que, gracias a ese porcentaje de diferencia entre fincas, se podría aprovechar en programas de mejoramiento genético e incluso esta diversidad podría ser empleada para conservación como lo proponen [60].

La heterocigocidad esperada (H_e) promedio fue de 0.388, superando los obtenidos por [59] de 0.279, posiblemente porque solo lograron amplificar 3 microsátélites junto con un número reducido de individuos (27) y con el trabajo de [48] que tras estudiar 21 ecotipos de *Rubus* mediante microsátélites amplificados al azar (RAM's) obtuvieron de (H_e) promedio 0.29, con lo que finalmente concluyeron que la diversidad genética de la zona de estudio era baja con lo que sugieren la necesidad de planes de manejo para incrementar la diversidad, sin sacrificar los materiales adaptados a la región previamente establecidos. En lulo Coronado et al. (2017), estimaron una H_e muy parecida de 0.36, este valor se lo atribuyen a la naturaleza alógama de la especie que este caso coincide con el origen del *R. glaucus*. [27] y [29] obtuvieron respectivamente de H_e 0.456 y 0.61, 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 propuestos por [40], [41], se puede decir que todos los microsátélites empleados son como mínimo informativos ya que G01 fue el que presentó el menor PIC=0.23 pero R167h, R251a, R47a, R228a, R285a y R123a superaron el rango inferior (0.25) para poder catalogarlos como altamente informativos. Además, podemos seleccionar a estos 3 últimos microsátélites como los “mejores”, si tenemos en cuenta que correspondientemente también presentaron los más altos valores de H_e (0.416, 0.437 y 0.438 respectivamente), como los más informativos para ser considerados en futuros trabajos. Estos resultados podrían compararse con los presentados por [63] quienes en promedio obtuvieron menor PIC (0.25) con el marcador dominante “Inter Secuencias Simples Repetidas” ISSR, en solo 19 genotipos de *R. idaeus* de la costa del mar negro en Turquía. Mientras que Sedighi y Rahimmalek [64] detectaron un PIC promedio (0.434) superior al de este trabajo (0.302) tras analizar 250 individuos de 25 poblaciones, pero procedentes de diferentes regiones geográficas de Irán, donde esta amplia distribución pudo permitir detectar mayor diversidad de alelos y por ende mayor PIC.

5. Conclusiones

Este trabajo, proporciona un set de microsátélites (R47a, R123a, R167h, R228a, R251a y R285a) evaluados que pueden ser una opción eficiente y concreta para que sean implementados en futuros trabajos.

Se evidenció que los individuos de mora de Castilla evaluados presentan diferencias en sus huellas genéticas, por lo que se puede considerar que hay una diversidad genética de moderada a alta.

La diferencia en la huella genética, del material procedente de la vereda Sabaneta Alta, podría ser considerada para distribuir material desde este lugar hacia las otras veredas para aumentar su diversidad genética o viceversa, dependiendo de las características morfoagronómicas, organolépticas y de resistencia.

Reconocimientos

A la Universidad de Pamplona y al laboratorio Mascolab que permitieron la realización de la presente investigación.

Referencias

- [1] D. Potter *et al.*, "Phylogeny and classification of Rosaceae," in *Plant Systematics and Evolution*, 2007, vol. 266, no. 1–2. doi: 10.1007/s00606-007-0539-9.
- [2] J. Y. Huang and 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 and M. Woodhead, "Raspberries and Blackberries: The Genomics of *Rubus*," in *Genetics and Genomics of Rosaceae*, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-77491-6_24.
- [5] M. Mimura, M. Mishima, M. Lascoux, and 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 *Ideaobatus* 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, and 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. Armes 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, and 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 and M. J. Giraldo, "El cultivo de la mora." p. 83, 2001.
- [11] J. Restrepo and R. Sánchez, "Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth) Medidas para la temporada invernal," *Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)*, 2011.
- [12] R. Orozco-Rodríguez, D. Flores-Mora, and 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.
- [13] G. O. Cancino-Escalante, E. Q. García, C. E. Villamizar, and 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.
- [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 and H. Nybom, "Discrimination between Sexual Recombination and Apomixis Automixis 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, and 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. Flagel, J. Kniskern, and 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, and 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, and 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 elite de mora (*Rubus glaucus* Benth.) mediante marcadores SSRs.," Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia, 2011.
- [26] M. L. Marulanda, A. M. López, and M. Uribe, "Genetic Diversity and Transferability of *Rubus* Microsatellite Markers to South American *Rubus* Species," in *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, 2012. doi: 10.5772/32838.
- [27] M. L. Marulanda, A. M. López, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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 and 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 and 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, and 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] D. González-Cerritos, C. A. Núñez-Colín, E. Villordo-Pineda, G. Medina-Ramos, and 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.
- [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 and 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, and 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., and 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, and Y. Morillo Coronado, "Análisis de la diversidad genética de la mora (Rubus spp.) en el departamento de Boyacá," *Bioteconología 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 and 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 and 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 and 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, and 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, and 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, sciELO, pp. 386–399, 2007, doi: 10.4067/S0717-34582007000300006.
- [56] S. G. Khoei, B. A. Mandoulakani, and 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] Y. Zheng, S. Xu, J. Liu, Y. Zhao, and J. Liu, "Genetic diversity and population structure of Chinese natural bermudagrass [Cynodon dactylon (L.) Pers.] germplasm based on SRAP markers," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 5, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0177508.
- [58] 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.
- [59] M. L. Marulanda, A. M. López, and 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.
- [60] 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.
- [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 and 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] C. Cekic, O. Calis, and 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/aer/1605_68356843.
- [64] E. Sedighi and 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.