

## Caracterización molecular de genotipos de *Rubus* mediante marcadores microsatélites

### Molecular characterization of *Rubus* genotypes by microsatellite markers

Sara Roa Delgado<sup>1\*</sup>, Hilda Fernández González<sup>2</sup>, Luis Angulo Graterol<sup>3</sup>, Nora Useche Carrillo<sup>2</sup> e Yreny De Faría Muñoz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), estado Táchira y <sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). <sup>3</sup>Universidad Central de Venezuela (UCV). Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA). Maracay, estado Aragua. Venezuela.

\*Correo electrónico: sroa@inia.gob.ve, sararoadelgado@gmail.com.

#### RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), así como varias especies silvestres en Venezuela, se ubican en zonas de laderas con altitudes superiores a los 1.500 m. A pesar de ser un frutal de mucha importancia en el país, por sus propiedades nutraceuticas y por la actividad económica que genera para los productores de las zonas altas, poco se conoce acerca de la variabilidad genética de este género y su vulnerabilidad por la pérdida de su hábitat natural y los ataques de plagas y enfermedades. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad genética existente en una muestra de 65 genotipos de *Rubus* cultivados y silvestres colectados en los estados Táchira, Mérida y Aragua, utilizando marcadores microsatélites. Se evaluaron 16 primers microsatélites, de los cuales seis fueron polimórficos y generaron 18 bandas polimórficas con un promedio de 2,83 alelos por locus. El análisis molecular reveló una alta similitud en los genotipos de *R. glaucus*, debido posiblemente al empleo de pocos iniciadores específicos, a la propagación vegetativa y a la cercana ubicación geográfica de los genotipos cultivados y silvestres.

**Palabras clave:** *Rubus glaucus* Benth, mora de castilla, variabilidad genética, especies silvestres.

#### ABSTRACT

The andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth), as well as, several wild species in Venezuela are found on hillsides located above 1.500 m. Despite of being an important fruit crop in the country, because of the nutraceutical properties and the great economical value of the activity for the producers, too little is known about its genetic variability and its vulnerability due to the loss of their natural habitats and pest and disease damages. The objective of this work was to characterize the genetic variability of a sample composed by 65 cultivated and wild *Rubus* genotypes collected in the states of Táchira, Mérida and Aragua. Microsatellite markers were used to characterize their genetic variability. A number of 16 microsatellite primers were evaluated, 6 of which were polymorphic, generating 18 polymorphic fragments with an average of 2,83 alleles per locus. The molecular analysis revealed a great similarity among the *R. glaucus* genotypes possible due to the use of few specific primers, the vegetative propagation of this crop and that genotypes were collected in nearby geographical regions.

**Key words:** *Rubus glaucus* Benth, blackberries andean, genetic variability, wild species.

## INTRODUCCIÓN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia de las *Rosáceas*. El género *Rubus* es bastante difundido en el mundo, se estima que existen unas 400 ó 500 especies con hábito de crecimiento bianual y perennes que pueden reproducirse sexual o apomícticamente. El número básico de cromosomas es 7, con niveles de ploidía desde diploides  $2x=2n=14$  hasta dodecaploides  $12x=2n=84$  (Marulanda *et al.*, 2007; Cancino *et al.*, 2011).

La especie *R. glaucus* es originaria de las zonas altas tropicales de América, principalmente Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y El Salvador (Avilán *et al.*, 1992; Franco y Giraldo, 2000). Sus frutos se consumen de forma fresca y procesada, como en jugos, mermeladas, vinos, entre otros (Darrow, 1952; Bautista, 1977).

Las especies latinoamericanas del género *Rubus* se encuentran agrupadas principalmente en tres subgéneros: *Rubus*, *Idaeobatus* y *Orobatus*, este último, exclusivo de Suramérica (Ballington *et al.*, 1993; Marulanda *et al.*, 2007). La mora de castilla se considera un híbrido porque combina características de los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus*, además es un anfidiplóide fértil (Jennings, 1998; Marulanda *et al.*, 2007).

En Venezuela, la mora constituye un frutal promisorio y de gran importancia comercial. Cultivado principalmente en los estados andinos y en menor proporción en zonas altas de los estados Lara y Aragua.

Comúnmente, en las zonas de producción del país se consiguen otras especies de *Rubus* silvestres creciendo junto a la mora cultivada, con serio peligro de pérdida de diversidad. Sin embargo, se conoce poco de la ubicación de estas especies silvestres, su cuantificación y la diversidad genética existente intra e interespecíficamente (Roa, 2014).

La diversidad genética de una especie puede medirse de diferentes formas, la más común es mediante descriptores morfológicos. No obstante, las condiciones ambientales influyen en la manifestación de ciertos caracteres fenotípicos

como el color de los tallos y flores, que pueden interpretarse erróneamente como variabilidad genética dentro de una especie, cuando lo que ocurre realmente es una adaptación diferencial entre poblaciones (Marshall *et al.*, 2001; Roa *et al.*, 2010).

Los marcadores moleculares son una herramienta útil para medir la diversidad genética. Estos revelan polimorfismo a nivel de ácido desoxirribonucleico (ADN) y resultan un método más directo y confiable que los descriptores morfológicos, principalmente porque no están influenciados por el ambiente, pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta y se encuentran en todo el ADN del individuo.

En especies cultivadas y silvestres de *Rubus*, se ha estudiado la diversidad genética utilizando marcadores moleculares, como polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y microsatélites (Morillo *et al.*, 2005; Marulanda *et al.*, 2006; Salvini *et al.*, 2006). Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (2 a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, distribuidas al azar por todo el ADN; pueden o no estar asociadas con genes; son loci altamente mutables; son codominantes y multialélicos; y el polimorfismo se puede visualizar mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida (Spooner *et al.*, 2005; Posso y Ghneim, 2008; Asofeifa, 2006).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente la variabilidad genética existente entre genotipos de *Rubus* cultivados y silvestres colectados en los estados Táchira, Mérida y Aragua, utilizando marcadores moleculares microsatélites.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal fue conformado por muestras de genotipos de la especie cultivada *R. glaucus* (53 muestras); las especies silvestres *R. adenotrichus* (6 muestras), *R. niveus* (una muestra) y *R. idaeus* (5 muestras), para un total de 65 muestras. Las especies *R. glaucus* y *R. adenotrichus* corresponden al subgénero *Rubus*, mientras que las especies *R. niveus* y *R. idaeus* pertenecen al subgénero *Idaeubatus*.

En el Cuadro 1 se observa la ubicación de los sitios de muestreo de los diferentes genotipos. Las colectas del tejido foliar se realizaron en los biomas de acuerdo a la clasificación mencionada por Ewel *et al.* (1976). En el estado Táchira los muestreos se realizaron en los municipios Jáuregui, San Simón, Michelena, (zonas de bosque seco montano bajo y bosque muy húmedo montano); Junín y Urdaneta (bosque húmedo montano bajo y bosque seco premontano) y Uribante (bosque muy húmedo premontano); en el estado Mérida, en los municipios Santos Marquina, Libertador (bosque muy húmedo montano) y Caracciolo Parra (bosque húmedo montano bajo y bosque muy húmedo montano); y en el estado Aragua, en el municipio Tovar, ubicado en la Cordillera de la Costa, en la zona denominada bosque nublado.

Las zonas de muestreo correspondieron a los biomas denominados selvas nubladas y páramos (Hernández, 1998).

### Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción del ADN se realizó usando el Kit PROMEGA®, siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 0,1 g de tejido foliar y macerado en un mortero con nitrógeno líquido.

La evaluación de la calidad y concentración de los ADN se realizó en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio, mediante la técnica de electroforesis horizontal, en una cámara marca Bio-Rad Power PAC 3000, a 100 voltios y 50 miliamperios, durante media hora, utilizando tampón TBE 0,5X (54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5 M). Se utilizó el bacteriófago Lambda a una concentración de 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  como referencia. Se usó un Spectrophotometro Nano Drop 1000 para determinar la concentración de ADN (ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) y la pureza. Los ADN se diluyeron a una concentración de 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  con tampón TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA) y se almacenaron a -20 °C.

### Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron 16 pares de cebadores microsatélites (Cuadro 2) sintetizados por Eurogentec® (Amsellen *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2006 y Marulanda *et al.*, 2011).

Cada reacción de PCR consistió en 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  de ADN; 1,67 X de tampón; 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,33  $\mu\text{M}$  de cada iniciador; 0,40 mM de dNTPs; 0,33 mg  $\text{ml}^{-1}$  de albúmina bovina (BSA) y 0,06 U  $\mu\text{l}^{-1}$  de Taq polimerasa, para un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ . Se utilizó un termociclador MJ Research PTC-100 con 35 ciclos a una temperatura de alineamiento adecuada para cada par de iniciadores por 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min y extensión final a 72 °C por 10 min.

### Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis durante 2,5 horas a 90 V y 50 miliamperios en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 25 pares de bases (pb) para determinar los pb de los alelos para cada SSR. Los geles fueron digitalizados con el equipo Gel-Doc XR Imagen Sistem Bio-Rad y analizados con el programa Quantity One® versión 4.2. Se realizaron electrofóresis en geles de poliácridamida 6% utilizando la metodología de Posso y Ghneim (2009), para aquellos loci que no presentaron buena resolución en geles de agarosa.

### Análisis estadístico

A partir de los alelos obtenidos para cada locus microsatélite, se construyó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0). Se determinó el contenido de información polimórfica (PIC, siglas en inglés) de cada marcador de acuerdo a la fórmula:

$$n\text{PIC}_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2 \text{ en la cual,}$$

$P_{ij}$  es la frecuencia del  $j$  ésimo alelo, del  $i$  ésimo iniciador, y  $n$  son los alelos (Bonstein *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1993; Shuster *et al.*, 2009; Laurentin, 2009; Marulanda *et al.*, 2007, 2011).

Las relaciones genéticas entre los diferentes genotipos fueron estimadas usando el método WARD y el procedimiento de agrupación empleado para construir el dendrograma, fue el método de agrupamiento de pares no ponderados (UPGMA, siglas en inglés), utilizando la media aritmética (Sneath y Sokal, 1973) y el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Localización de sitios de muestreo de especies de *Rubus* en los estados Táchira, Mérida y Aragua.

Muestra	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Especie	Estado
2	Mesa de Aura	07°57'06"	72°06'30"	1.900	<i>R. idaeus</i>	Táchira
3	La Cúspide	08°02'49,50"	72°8'24,7"	1.992	<i>R. idaeus</i>	Táchira
4	Pueblo Hondo	08°15'13,89"	77°54'42,63"	2.388	<i>R. idaeus</i>	Táchira
5	La Laguna	07°51'3,2"	72°12'40,7"	1.247	<i>R. niveus</i>	Táchira
6	El Picacho	10°24'24,12"	67°18'41,54"	2.198	<i>R. adenotrichus</i>	Aragua
7	El Picacho	10°24'24,12"	67°18'41,54"	2.198	<i>R. adenotrichus</i>	Aragua
8	Los Loros	08°0'52,7"	72° 8'26,5"	2.328	<i>R. adenotrichus</i>	Táchira
9	El Picacho	10°24'24,12"	67°18'41,54"	2.198	<i>R. adenotrichus</i>	Aragua
10	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. adenotrichus</i>	Táchira
11	Pregonero	08°01'22"	71°45'32"	1.500	<i>R. adenotrichus</i>	Táchira
12	Angarabeca	07°59'53,4"	72°9'1,30"	2.454	<i>R. glaucus</i>	Táchira
13	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
14	Angarabeca	07°59'39,24"	72°12'40,7"	2.447	<i>R. glaucus</i>	Táchira
15	Angarabeca	07°59'39,24"	72°12'40,7"	2.447	<i>R. glaucus</i>	Táchira
16	Angarabeca	07°59'39,24"	72°12'40,7"	2.447	<i>R. glaucus</i>	Táchira
17	San Vicente	07°30'17,3"	72°20'32,4"	1.796	<i>R. glaucus</i>	Táchira
18	La Cúspide	08°02'28,2"	72°8'36"	1.973	<i>R. glaucus</i>	Táchira
19	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
20	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
21	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
22	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
23	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
24	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
25	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
26	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
27	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
28	Los Loros	08°0'52,7"	72°8'26,5"	2.328	<i>R. glaucus</i>	Táchira
29	Ventorrillo	08°18'26,41"	77°53'33,38"	1.895	<i>R. glaucus</i>	Táchira
30	San Simón	08°18'49,50"	77°53'20,17"	1.719	<i>R. glaucus</i>	Táchira
31	San Simón	08°18'49,50"	77°53'20,17"	1.719	<i>R. glaucus</i>	Táchira
32	Pueblo Hondo	08°15'13,89"	77°54'42,63"	2.388	<i>R. glaucus</i>	Táchira
33	Pueblo Hondo	08°15'13,89"	77°54'42,63"	2.388	<i>R. glaucus</i>	Táchira
34	Pueblo Hondo	08°15'13,89"	77°54'42,63"	2.388	<i>R. glaucus</i>	Táchira

..!... continúa

.../... continuación Cuadro 1.

Muestra	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Especie	Estado
35	Pueblo Hondo	08°15'13,89"	77°54'42,63"	2.388	<i>R. glaucus</i>	Táchira
36	Vega Grande	07°28'36"	72°20'59,1"	2.030	<i>R. glaucus</i>	Táchira
37	Vega Grande	07°28'36"	72°20'59,1"	2.030	<i>R. glaucus</i>	Táchira
38	Vega Grande	07°28'36"	72°20'59,1"	2.030	<i>R. glaucus</i>	Táchira
39	Palma y Oso	07°33'11"	72°25'53,4"	1.924	<i>R. glaucus</i>	Táchira
40	Palma y Oso	07°33'11"	72°25'53,4"	1.924	<i>R. glaucus</i>	Táchira
41	Palma y Oso	07°33'11"	72°25'53,4"	1.924	<i>R. glaucus</i>	Táchira
42	Villa Páez	07°29'28"	72°26'39,6"	2.217	<i>R. glaucus</i>	Táchira
43	Villa Páez	07°29'28"	72°26'39,6"	2.217	<i>R. glaucus</i>	Táchira
44	Angarabeca	07°59'39,4"	72°9'7,67"	2.447	<i>R. glaucus</i>	Táchira
45	Angarabeca	07°59'39,4"	72°9'7,67"	2.447	<i>R. glaucus</i>	Táchira
46	S. J. del Valle	08°40'50,3"	71°05'57,4"	2.215	<i>R. glaucus</i>	Mérida
47	BellaVista	08°42'42,8"	71°04'43,6"	2.517	<i>R. glaucus</i>	Mérida
48	BellaVista	08°42'42,8"	71°04'43,6"	2.517	<i>R. glaucus</i>	Mérida
49	Las Cuadras	08°40'18,6"	71°06'24,3"	2.162	<i>R. glaucus</i>	Mérida
50	Monterrey	08°39'59"	71°06'3,9"	2.116	<i>R. glaucus</i>	Mérida
51	Betijoque	08°16'33,1"	71°55'52,5"	1.892	<i>R. glaucus</i>	Táchira
52	Pregonero	08°01'22"	71°45'32"	1.500	<i>R. glaucus</i>	Táchira
53	Pregonero	08°01'22"	71°45'32"	1.500	<i>R. glaucus</i>	Táchira
54	Pregonero	08°01'22"	71°45'32"	1.600	<i>R. glaucus</i>	Táchira
55	Bramón	07°39'26"	72°14'10"	1.050	<i>R. glaucus</i>	Táchira
56	Bramón	07°39'26"	72°14'10"	1.050	<i>R. glaucus</i>	Táchira
57	Las Cumbres	07°58'02"	72°22'30"	1.700	<i>R. glaucus</i>	Táchira
58	Las Cumbres	07°58'02"	72°22'30"	1.700	<i>R. glaucus</i>	Táchira
59	Las Cumbres	07°58'02"	72°22'30"	1.700	<i>R. glaucus</i>	Táchira
60	Cruz Verde	10°24'21,67"	67°17'21,7"	1.789	<i>R. glaucus</i>	Aragua
61	Las Cumbres	07°58'02"	72°22'30"	1.700	<i>R. idaeus</i>	Táchira
62	Cruz Verde	10°24'21,67"	67°17'21,7"	1.789	<i>R. glaucus</i>	Aragua
63	Pregonero	08°01'22"	71°45'32"	1.500	<i>R. glaucus</i>	Táchira
64	Cruz Verde	10°24'21,67"	67°17'21,7"	1.789	<i>R. glaucus</i>	Aragua
65	Cruz Verde	10°24'21,67"	67°17'21,7"	1.789	<i>R. glaucus</i>	Aragua
66	Cruz Verde	10°24'21,67"	67°17'21,7"	1.789	<i>R. idaeus</i>	Aragua

Cuadro 2. Marcadores microsatélites utilizados y temperaturas de alineamiento.

Iniciador	Secuencia	Alineamiento (°C)
mRACIRRI1G3 <sup>1</sup>	F:CTCTACAAAAGGATCTGCATGA R:CAGCAAAAAGTGAAATGGTTCA	43
CHE1AY500562 <sup>2</sup>	F:ATTTGGAAGTGGTTGAATGCGGCGG R:TATCTTCTTTATAGTCCTTAGG	43
CHE3AY500565 <sup>2</sup>	F:TCATCATAGGCGTGGAGCTAGTG R:CTGTTCTAGAGAGCTGTGACCG	52
CHE5AY500570 <sup>2</sup>	F:CAAAACAAACAACAGACCATTATAC R:CCATTTGAGTAAGAAGTTAATTAG	45
CHE6AY500571 <sup>2</sup>	F:AGGGGGTGAAGCTAAGGAAGGGGG R:TGTGATTTGCATTCTTTATTACAGC	46
CHE7AY500573 <sup>2</sup>	F:CGCCAACTAATCAACCAAACG R:GTCCTCACATTCGCTTACGCC	52
CHE8AY500574 <sup>2</sup>	F:AATGAACTTACCGCTCCACGATGG R:CCTCCTTCATTGCTGTTGACGG	52
CHE9AY500575 <sup>2</sup>	F:TAAGTTGTGGAGAGATATAGTCACG R:GACTTGGTGTCTTCATTGAGTGGG	49
CHE10AY500 577 <sup>2</sup>	F:ACCATCAGAATTTACCCACCACCC R:ATCATCATCAACAGAGTCTCCC	51
CHE12AY500 582 <sup>2</sup>	F:ATCGGGGATTTGGTGTGGGTTTAGG R:ATTGTGTGCATCACTCTGAGAACCG	52
CHE13AY500 586 <sup>2</sup>	F:ACGGCTTAGTCGTGGTCCAAATTCC R:GAGAACACCTTATGTGAAAAGTTGC	50
CHE14AY500 587 <sup>2</sup>	F:AGAGAGAAGTGTGACAGTGAGCTGG R:GTTGTA ACTATG TACTGCTACTCCC	49
CHE15AY500 589 <sup>2</sup>	F:ACAGCCGTCAACA ACTTTTACCGCC R:TAACACAACCACAACAATTACACC	47
Rg A6 <sup>3</sup>	F:AGCGCAAGGACTTCTACC R:TTCAGCTCCGGTAGTAGC	56
Rg A12-1 <sup>3</sup>	F:TCATGTCATGTTTCGTGTG R:CTAACACGCGATAGAATAGG	48
Rg D7 <sup>3</sup>	F:AACCATCGGTGTCGACCTC R:GGCTCTTGACCGGTA ACTTAG	58

Se calculó el coeficiente de correlación cofenética (CCC) como medida de la confiabilidad del análisis de agrupamiento UPGMA (Rohlf y Sokal, 1981) y se realizó el análisis de coordenadas principales (Sneath y Sokal, 1973) con el programa InfoStat Profesional versión 1.1. (Di Rienzo *et al.*, 2007).

Se realizó un análisis de procrustes generalizados con los datos de caracterización morfológica (Roa, 2014) y molecular de 9 muestras de *R. glaucus*, 1 muestra de *R. idaeus* y 1 muestra de *R. adenotrichus*, colectadas en el estado Táchira (Cuadro 1).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 16 marcadores SSR evaluados, seis resultaron polimórficos y fueron seleccionados para la caracterización molecular, por sus bandas polimórficas, claras y definidas (Cuadro 3).

Se obtuvieron en total 18 bandas polimórficas, con un promedio de 2,83 alelos por locus y tamaños entre 100 y 225 pb, estos resultados son consistentes con los de Lopes *et al.* (2006), para los iniciadores CHE8 AY500574 y CHE10AY500577 quienes alcanzaron tamaños de bandas dentro de estos rangos, aunque el número de alelos para estos loci fue mayor.

En cuanto al iniciador mRaCIRRI1G3, otros autores reportaron resultados similares, Marulanda *et al.* (2006 y 2011) obtuvieron 3 alelos y tamaños de banda cuyo rango osciló entre 195 y 265 pb con un PIC de 0,5473; mientras que Amsellem *et al.* (2001) mencionan un promedio de 2,4 alelos por locus entre 195 y 265 pb, lo cual confirma la utilidad de este iniciador para estudios de variabilidad genética en especies de *Rubus*.

El iniciador CHE8AY500574 fue el que presentó el mayor PIC, mientras que CHE5 AY500570 y RgA12-1 presentaron la mayor cantidad de alelos por locus. Los microsatélites que resultaron polimórficos, tienen potencial utilidad para caracterizar gemoplasma de *Rubus*, por lo

cual pueden ser seleccionados de acuerdo a la información que proporcionaron.

En el análisis por el método WARD y el de agrupamiento, se observó la formación de dos grupos con una distancia de 160. En el primer grupo se ubicaron solo genotipos de *R. glaucus* de los estados Táchira, Mérida y Aragua, con la excepción del genotipo 66 (*R. idaeus* de Aragua) y la mayor distancia fue de 25. El segundo grupo se conformó por dos subgrupos, en el primero se ubicaron los genotipos silvestres *R. idaeus*, *R. niveus* (colectados en Táchira), *R. adenotrichus* (colectados en Táchira y Aragua) y genotipos cultivados de *R. glaucus* colectados en Táchira; y el otro subgrupo se conformó con genotipos de *R. glaucus* colectados en Táchira y el genotipo 47 de *R. glaucus* colectado en el estado Mérida.

No se observó agrupación de genotipos de acuerdo a su ubicación geográfica (Figura 1).

El valor del CCC fue 0,725, lo cual demuestra que hubo poca distorsión entre el modelo propuesto y los datos analizados.

La agrupación de genotipos de diferentes subgéneros en un mismo subgrupo se debió a la similitud taxonómica que existe entre los subgéneros, dependiendo del marcador que participó en la delimitación del subgrupo, tal como señala Cancino *et al.* (2012).

Cuadro 3. Nombre, número de alelos, contenido de información polimórfica (PIC) y tamaño de los fragmentos obtenidos con los seis microsatélites.

Locus	N° de alelos	PIC	Tamaño (pb)
RgA6	2	0,60	150-175
CHE8 AY500574	2	0,92	200-225
CHE5 AY500570	4	0,89	175-225
mRaCIRRI1G3	3	0,65	175-200
CHE10AY500577	3	0,90	100-125
RgA12-1	4	0,84	176-215

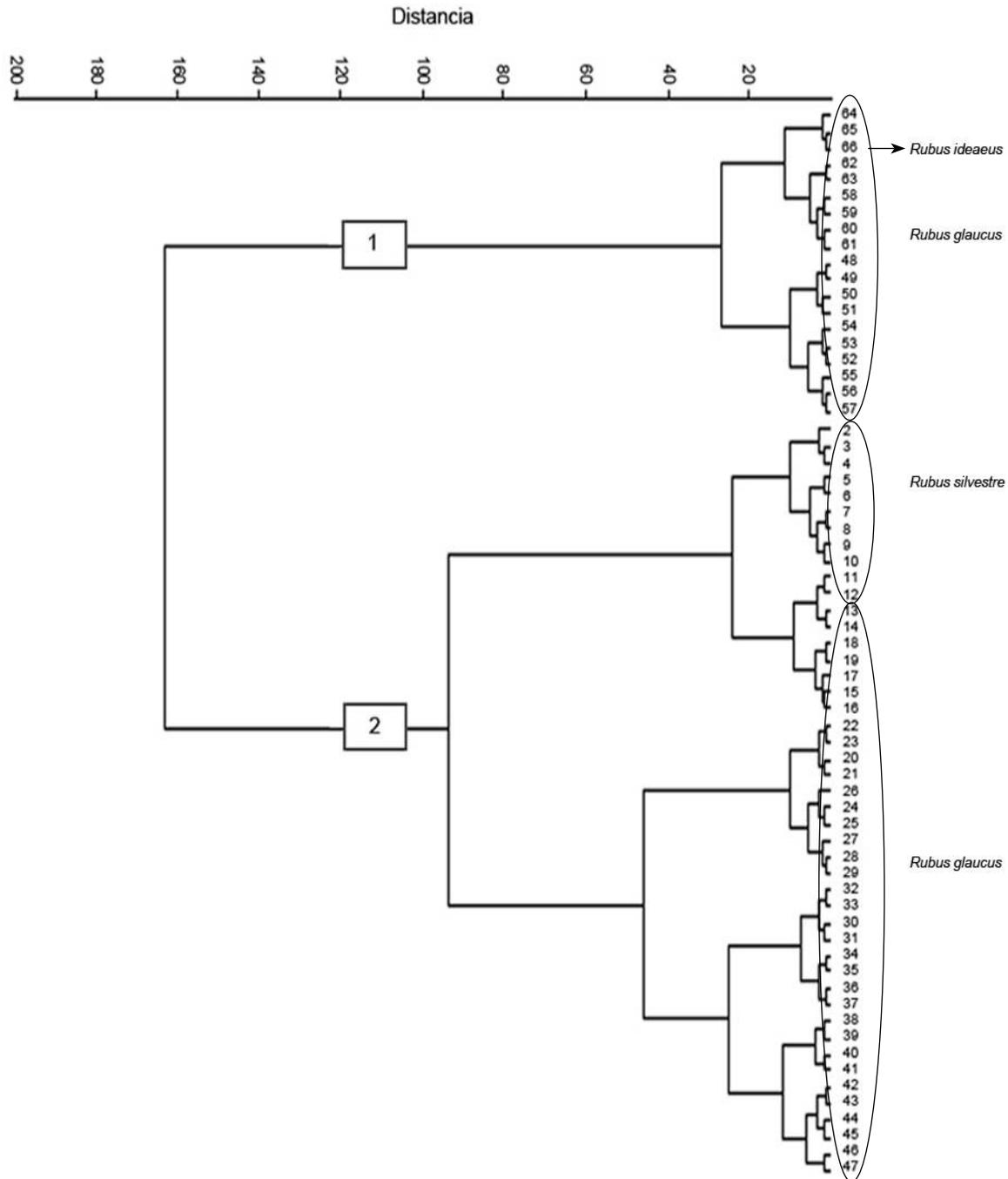


Figura 1. Análisis de conglomerados para los genotipos de *Rubus* estudiados utilizando el método WARD.

En el análisis de coordenadas principales empleando dos componentes, se observaron resultados similares al análisis de conglomerados, formándose dos grupos. Mediante este análisis se explicó el 33,5% de la variabilidad genética total (Figura 2).

En el análisis de procrustes generalizado, el consenso entre la ordenación de los datos genéticos y la obtenida a partir de los datos morfológicos fue 78,6%, lo cual mostró la concordancia entre la caracterización morfológica y la caracterización molecular.

Entre los factores que pudieran ser la causa para explicar la similitud entre los genotipos de *Rubus* estudiados se tiene: la utilización de iniciadores de las especies *R. alceifolius* y *R. hochstetterorum*, los cuales han empleado con éxito en la especie *R. idaeus* (excepto RgA12-1 y RgA6 obtenidos de *R. glaucus*); las regiones amplificadas corresponden a regiones muy conservadas; se incluyeron pocas muestras de los estados Mérida y Aragua; las especies estudiadas son de polinización abierta,

aunque también se observó apomixis (Nybom, 1995; Marmolejo, 2010); posible hibridación interespecífica; las especies silvestres crecen muy cerca de los lotes comerciales de *R. glaucus*; muchos de los genotipos de *R. glaucus* muestreados, comparten nichos ecológicos similares; además, los productores propagan la especie *R. glaucus* principalmente por estacas e intercambian este material de siembra dentro de los estados muestreados y entre ellos; también se siembran plantas que hayan crecido de semillas germinadas en los propios lotes del cultivo.

Los factores mencionados han sido reportados por otros autores como causantes de la similitud entre genotipos de especies silvestres y cultivados de *R. glaucus* (Garrido *et al.*, 2010; Marulanda *et al.*, 2007, 2011) y entre genotipos cultivados de *R. glaucus* (Espinosa, 2011).

Marulanda *et al.* (2012) caracterizaron molecularmente 44 genotipos de *R. glaucus* con y sin espinas, cultivados y no cultivados, el valor obtenido para la similitud fue casi 90% para los

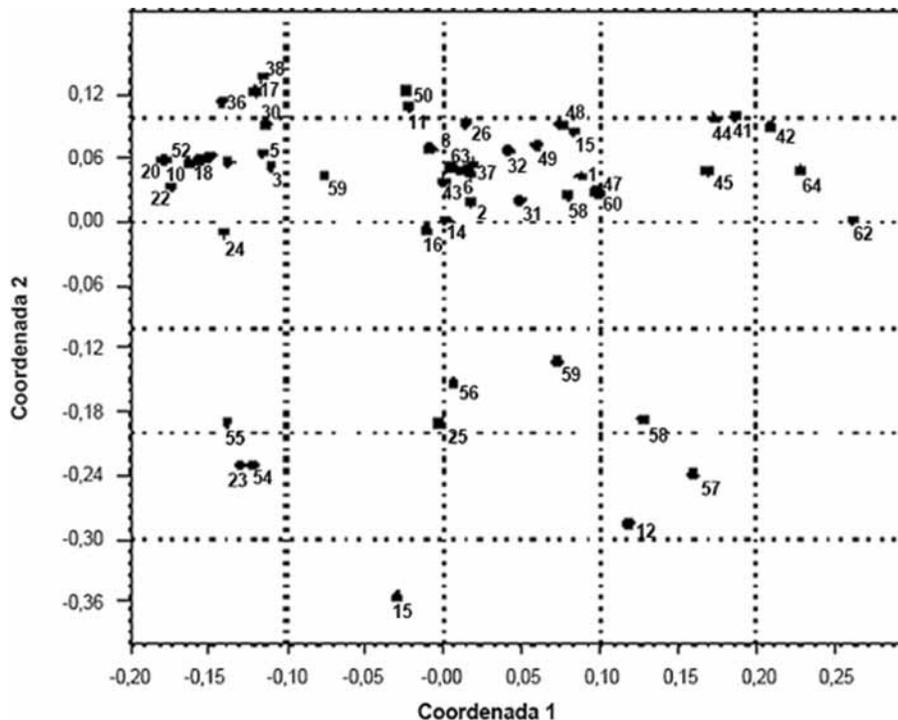


Figura 2. Análisis de coordenadas principales para los genotipos de *Rubus*, basado en la distancia de DICE.

genotipos cultivados y el análisis de agrupamiento basado en las distancias genéticas, no dependió de sus sitios de origen; los genotipos silvestres se separaron de los cultivados y los genotipos sin espinas se ubicaron en diferentes grupos.

### CONCLUSIONES

El empleo de los marcadores moleculares microsatélites para caracterizar la variabilidad genética presente en genotipos de *Rubus*, es una herramienta útil que permitió determinar el grado de similitud genética entre los genotipos estudiados.

Los resultados de este trabajo permitirán seleccionar los padres ubicados en alguno de los dos grupos resultantes del análisis de conglomerados para iniciar un programa de mejoramiento genético, seleccionando las especies más divergentes. Así como, lograr transferir aquellas características de importancia a partir de las especies cultivadas relacionadas y materiales silvestres, con la finalidad de producir variedades adaptadas a nuevos patrones de consumo, cultivo y cambio climático.

Se recomienda utilizar mayor número de marcadores específicos de *R. glaucus*, con el objetivo de estudiar más detalladamente la variabilidad genética presente en los cultivares sembrados en cada zona de producción.

Es necesario continuar con los trabajos de localización y caracterización morfológica y molecular de germoplasma de *Rubus*, para diseñar estrategias de conservación de especies silvestres, tanto *ex situ* como *in situ*, a fin de garantizar la preservación y uso eficiente de recursos genéticos disponibles en la obtención de nuevos cultivares.

### LITERATURA CITADA

- Amsellem L., C. Dutech and N. Billotte. 2001. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Rubus alceifolius* Poir. (*Rosaceae*), an invasive weed in La Reunion Island. *Molecular Ecology Resources* 1(1-2):33-35.
- Anderson J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36(1):181-186.
- Asofeifa A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2):221-242. (ISSN: 1021-7444).
- Avilán L., F. Leal y D. Batista. 1992. Manual de fruticultura. Editorial América. Caracas, Venezuela. 1.464 p. (ISBN 980-6131-29-0).
- Ballington J.R., M. Lutein, K. Thompson, K. Romoleroux and R. Castillo. 1993 *Rubus* and acciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador. *Plant Genetic Resources Newsletter* 93:9-15.
- Bautista, D. 1977. Observaciones sobre el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth) en los andes venezolanos. *Agronomía Trop.* 27(2):253-260.
- Bonstein D., R. White, M. Skolnick and R. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Cancino G., L. Sánchez, E. Quevedo y C. Díaz. 2011. Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región nororiental de Colombia. *Universitas Scientiarum* 16(3):219-233.
- Cancino G., D. Barbosa y C. Diaz. 2012. 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 Universidad de Pamplona*. ISSN (versión impresa) 0120-4211. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.id90326398002>. [Ago. 15, 2013].
- Darrow G. 1952. *Rubus glaucus*, the Andes blackberry of Central America and Northern South America. *Ceiba* 3:97-101.
- Ewel J., A. Madriz y J. Tosi. 1976. Zonas de vida de Venezuela. MAC FONAIAP. 2da. Edición. Caracas. Venezuela. 270 p.

- Espinosa N. 2011. Evaluación morfoagronómica y caracterización molecular de la colección de mora de CORPOICA y materiales del agricultor. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Escuela de Posgrado. Bogotá, Colombia.
- Di Rienzo J., M. Balzarini, F. Casanoves, L. González, M. Tablada, C. Robledo. 2007. InfoStat. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Franco G. y M. Giraldo. 2000. El cultivo de la mora. Manizales, Colombia. 130 p. (ISBN 958-96720-0-0).
- Garrido P., W. Vásquez y E. Morillo. 2010. Análisis de la diversidad genética de la mora cultivada (*Rubus glaucus* Benth) y especies emparentadas en zonas productivas del Ecuador mediante marcadores moleculares. Centro Internacional de Agricultura Trop. Disponible en línea: [http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/final\\_infotec\\_06\\_16.pdf](http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/final_infotec_06_16.pdf). [Oct. 10, 2012].
- Hammer Ø., D. Harper and P. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1-9. 178 Kb. Disponible en línea: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). [Oct. 08, 2012].
- Hernández S. 1998. Gran Enciclopedia de Venezuela. 1:119-137. Editorial Globe. Venezuela
- Jennings D.L. 1988. Raspberries and blackberries: Their breeding, diseases and growth. Academic Press, New York, 230 p.
- Laurentin H. 2009. Data análisis for characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56:277-292.
- Lopes M.S., G. Belo Maciel, D. Mendonça, F. Sabino Gil and A. Da Cámara Machado. 2006. Isolation and characterization of simple sequence repeat loci *Rubus hochstetterorum* and their use in other species from the *Rosaceae* family. *Molecular Ecology* 6(3):750-752.
- Marshall B., R.E. Harrison, J. Graham, J.W. McNicol, G. Wright and G.R. Squire. 2001. Spatial trends of phenotypic diversity between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus*. *New Phytologist* 151(3):671-682
- Marulanda M.L., A.M. López y S.B. Aguilar. 2006. Diversidad genética del género *Rubus* presente en la región cafetera, Colombia. pp. 14-40. In: VI Seminario Internacional de Frutas Tropicales, Abstracts Book. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.
- Marulanda M.L., A.M. López y S.B. Aguilar. 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7:242-252.
- Marulanda M.L., A.M. López and M. Uribe. 2011. Genetic Diversity and transferability of *Rubus* microsatellite markers to south american *Rubus* species, The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-50154, Disponible en línea: [http://www.intechopen.com/books/the\\_molecular\\_basis\\_of\\_plant\\_genetic\\_diversity](http://www.intechopen.com/books/the_molecular_basis_of_plant_genetic_diversity). [May. 05, 2010].
- Marulanda M.L., A.M. López and M. Uribe. 2012. Molecular characterization of de andean blackberry, *Rubus glaucus*, using SRR markers. *Genetic and Molecular Research* 11(1):322-331.
- Marmolejo D. 2010. Evaluación de apomixis en germoplasma seleccionado de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en línea: [http://www.bdigital.unal.edu.co/3696/1/7208003.2010\\_capitulo1a14\\_pag1a41.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/3696/1/7208003.2010_capitulo1a14_pag1a41.pdf) [Ago. 15, 2014].
- Morillo C., A. Morillo, Y. Muñoz, J. Vásquez, H. Herney y H. Zamorano. 2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMS de la colección de mora, *Rubus* spp., de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. *Acta Agronómica*. 54(2):15-24.
- Nybom H. 1995. Evaluation of interspecific crossing experiments in facultatively apomictic blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*) using DNA fingerprinting. *Hereditas* 122:57-65.

- Posso D. y T. Ghneim. 2008. Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. Manual de laboratorio. Caracas, Venezuela. 72 p. (ISBN: 978-980-261-093-8).
- Posso D. y T. Ghneim. 2009. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida. Protocolos de laboratorio UEG Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe. Venezuela. Disponible en línea: <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/>. [Ago. 08, 2012].
- Quantity One®. Disponible en línea: [www.uvic.ca/medsci/assets/docs/research-facilities/quantity-one-user-guidel.pdf](http://www.uvic.ca/medsci/assets/docs/research-facilities/quantity-one-user-guidel.pdf). [Jul. 07, 2012].
- Roa S. 2014. Variabilidad genética en mora (*Rubus* spp.) presente en los estados Táchira, Mérida y Aragua y su conservación *in vitro*. Tesis doctoral. Escuela Socialista de Agricultura Tropical. Maracay, Venezuela. 103 p.
- Roa S., C. Barboza y A. Zambrano. 2010. Estabilidad del rendimiento de variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) para procesamiento industrial en el estado Táchira, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 27(2):173-192.
- Rohlf F. and R. Sokal. 1981. Comparing numerical taxonomic studies. Systematic Zoology 30:450-490.
- Salvini D., S. Fineschi, R. Pastorell, F. Sebastiani and G. Vendramin. 2006. Absence of geographic structure in european populations of *Rubus fruticosus* L. complex using chloroplast DNA Microsatellites. Journal of the American Society for Horticultural Science 131(5):616-621.
- Schuster I., E. Serra, J. Da Silva, F. Franco, V. Machioro. 2009. Genetic variability in brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology 32(3):557-56.
- Sneath P. and R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco. Freeman and Co Ltd. 573 p.
- Spooner D., R. van Treuren and M. De Vicente. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.