



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIA EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Diversidad genética de *Rubus* spp.

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

DIANA YARET TIERRABLANCA PLAZA

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO.



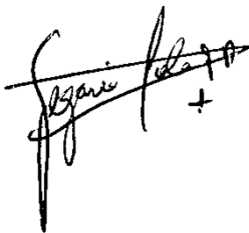
Chapingo, Estado de México, febrero de 2025

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Rubus* spp.

Tesis realizada por **DIANA YARET TIERRABLANCA PLAZA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR



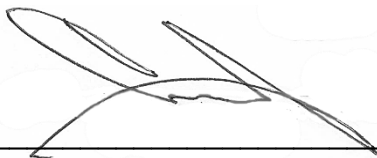
Dr. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

ASESOR



Dr. ALEJANDRO FACUNDO BARRIENTOS PRIEGO

ASESOR



Dr. CARLOS ALBERTO NUÑEZ COLÍN

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
Página.....	vii
DEDICATORIA	x
AGRADECIMIENTOS.....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xii
RESUMEN GENERAL.....	13
GENERAL ABSTRACT.....	14
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	15
1.1 Literatura citada.....	18
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA, MORFOLÓGICA Y NIVEL DE PLOIDÍA DE GENOTIPOS DE <i>Rubus</i> spp.	21
RESUMEN	21
CHAPTER II. TAXONOMIC, MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION AND PLOIDY LEVEL OF <i>Rubus</i> spp. GENOTYPES	22
ABSTRACT.....	22
2.1 INTRODUCCIÓN	23
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.2.1 Material vegetal	24
2.2.2 Identificación taxonómica y clasificación morfológica	25
2.2.3 Identificación citogenética.....	26
2.2.4 ANÁLISIS APLICADOS	27
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

2.3.1 Identificación taxonómica.....	28
2.3.2 Citogenética.....	40
2.4 CONCLUSIÓN	46
2.5 LITERATURA CITADA	47
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIEZ GENOTIPOS SILVESTRES DE <i>Rubus</i> spp. CON MARCADORES ISSR Y SSR	54
RESUMEN.....	54
CHAPTER III- MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TEN WILD GENOTYPES OF <i>Rubus</i> spp. USING ISSR AND SSR MARKERS.	55
ABSTRACT.....	55
3.1 INTRODUCCIÓN	56
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	57
3.2.2 Extracción de ADN.....	59
3.2.3 Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR)	59
3.2.4 Visualización de los productos amplificados en el PCR.....	61
3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
3.3.1 Iniciadores ISSR	62
3.3.2 Iniciadores SSR	67
3.3.3 Comparacion de los dendrogramas ISSR y SSR	75
3.4 CONCLUSIÓN	75
3.4 LITERATURA CITADA	76
CAPÍTULO IV. CORRELACIÓN DE ANALISIS MORFOLOGICO Y MOLECULAR DE ONCE GENOTIPOS DE <i>Rubus</i> spp.	81
RESUMEN.....	81

CHAPTER IV. CORRELATION OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSES OF ELEVEN GENOTYPES OF <i>Rubus</i> spp.....	82
ABSTRACT.....	82
4.1 INTRODUCCIÓN	83
4.2 MATERIALES Y METODOS	84
4.2.1 SITIO EXPERIMENTAL.....	84
4.2.2 MATERIAL VEGETAL	84
4.2.3 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA.....	85
4.2.4 EXTRACCIÓN DE ADN.....	85
4.2.5 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA	86
4.2.6 Visualización de los productos amplificados en el PCR.....	87
4.2.7 Análisis estadísticos.....	87
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	88
4.3.1 Comparación de dendrogramas molecular y morfológico.....	88
4.3.2 Prueba de Mantel.....	91
4.4 CONCLUSIÓN	91
4.5 LITERATURA CITADA.....	92
CONCLUSIONES GENERALES	96

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Genotipos de <i>Rubus</i> spp. utilizados para la identificación taxonómica, clasificación morfológica e identificación citogenética.	25
Cuadro 2. Características diferenciales de <i>Rubus</i> spp. silvestres.	38
Cuadro 3. Longitud promedio y número de los cromosomas de especies de <i>Rubus</i>	46
Cuadro 4. Genotipos, lugar de ubicación y número de cromosomas de <i>Rubus</i> spp. estudiados.	58
Cuadro 5. Secuencias de TM de los marcadores ISSR utilizados.	60
Cuadro 6. Secuencias de TM de los marcadores SSR utilizados.	60
Cuadro 7. Índice de Shannon, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectados en especies de <i>Rubus</i> , usando iniciadores ISSR.	63
Cuadro 8. Índice de Shannon, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectados en especies de <i>Rubus</i> , usando iniciadores SSR.	68
Cuadro 9. Genotipos, número de cromosomas y ubicación estatal de <i>Rubus</i> spp. estudiados.	84
Cuadro 10 Secuencia y T_M de iniciadores ISSR usados en este estudio.	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características vegetativas de <i>Rubus niveus</i> Thunb. a) ápice, b) tallo con estipula, c) pecíolo, d) haz de hoja y e) envés.	29
Figura 2. Características vegetativas de <i>Rubus glaucus</i> Benth. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.	30
Figura 3. Características vegetativas de <i>Rubus</i> aff. <i>glaucus</i> Rydb. a) ápice, b) tallo con estipula, c) haz de hoja y b) envés.	30
Figura 4. Características vegetativas de <i>Rubus adenotrichus</i> Schltdl. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.	31
Figura 5. Características vegetativas de <i>Rubus</i> aff. <i>liebmannii</i> . a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.	32
Figura 6. Características vegetativas de <i>Rubus pringlei</i> Rydb. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.	32
Figura 7. Características vegetativas de <i>Rubus eriocarpus</i> Liebm. a) ápice, b) tallo con estipula, c) haz de hoja y pecíolo, d) envés.	33
Figura 8. Características vegetativas de <i>Rubus</i> variedad comercial a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.	34
Figura 9. Características vegetativas de <i>Rubus sapidus</i> Schltdl. a) ápice, b) tallo con estipula, c) haz de hoja y pecíolo, d) envés.	35

Figura 10. Características vegetativas de <i>Rubus trilobus</i> Focke. a) ápice, b) tallo, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo con estipula, e) envés.	36
Figura 11. Características vegetativas de <i>Rubus parviflorus</i> Nuez. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal del tallo d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.	37
Figura 12. Árbol taxonómico de las 11 especies de <i>Rubus</i> spp.....	39
Figura 13. Agrupamiento de las 11 especies de <i>Rubus</i> por características morfológicas utilizando el método UPGMA.....	40
Figura 14. Conteo cromosómico de <i>Rubus niveus</i> $2n = 6X = 42$	41
Figura 15. Conteo cromosómico de a) <i>Rubus glaucus</i> $2n = 3X = 21$ y b) <i>Rubus</i> aff. <i>glaucus</i> $2n = 5X = 35$	41
Figura 16. Conteo cromosómico de <i>Rubus adenotrichus</i> $2n = 2X = 14$	42
Figura 17. Conteo cromosómico de <i>Rubus liebmanni</i> $2n = 4X = 28$	42
Figura 18. Conteo cromosómico de <i>Rubus eriocarpus</i> $2n = 4X = 28$	43
Figura 19. Conteo cromosómico de <i>Rubus pringlei</i> $2n = 7X = 49$	43
Figura 20. Conteo cromosómico de la variedad comercial de <i>Rubus</i> $2n = 4X = 42$	44
Figura 21. Conteo cromosómico de <i>Rubus sapidus</i> $2n = 12X = 84$	44
Figura 22. Conteo cromosómico de <i>Rubus trilobus</i> $2n = 3X = 21$	45
Figura 23. Conteo cromosómico de <i>Rubus parviflorus</i> $2n = 4X = 28$	45
Figura 24. Dendrograma de relaciones genéticas entre especies de <i>Rubus</i> , obtenido por el método de Nei-Lee (1979).	64
Figura 25. Gráfica tridimensional de coordenadas principales para ISSR que muestra los grupos formados entre las especies de <i>Rubus</i> . Grupo uno: <i>R. pringlei</i> (Rpri), <i>R. aff. Liebmannii</i> (ARl), <i>R. aff. glaucus</i> (ARg), <i>R. eriocarpus</i> (Re), <i>R. adenotrichus</i> (Ra) y <i>R. glaucus</i> (Rg). Grupo dos: <i>R. sapidus</i> (Rs) y <i>R. Vigas</i>	

comercial (Rcv). Grupo tres: <i>R. niveus</i> . Grupo cuatro: <i>R. trilobus</i> (Rt) y <i>R. parviflorus</i> (Rp).	67
Figura 26. Agrupación promedio, basado en el índice de similitud Dice por SSR, <i>R. pringlei</i> (Rpri), <i>R. aff. Liebmannii</i> (ARl), <i>R. aff. glaucus</i> (ARg), <i>R. eriocarpus</i> (Re), <i>R. adenotrichus</i> (Ra), <i>R. glaucus</i> (Rg), <i>R. sapidus</i> (Rs), <i>R. Vigas comercial</i> (Rcv), <i>R. niveus</i> , <i>R. trilobus</i> (Rt) y <i>R. parviflorus</i> (Rp).....	71
Figura 27. Comparación de morfología de hoja de A: <i>Rubus parviflorus</i> , B: <i>Rubus trilobus</i> , C: <i>Rubus glaucus</i> , D: <i>Rubus adenotrichus</i>	71
Figura 28. Comparación de morfología de hoja de A: <i>Rubus niveus</i> , B: afín <i>Rubus liebmannii</i> C: afín <i>Rubus glaucus</i> y D: <i>Rubus glaucus</i>	72
Figura 29. Dendrograma para SSR por el índice de similitud de Dice que muestra las relaciones genéticas entre especies de <i>Rubus</i>	73
Figura 30. Gráfica tridimensional de coordenadas principales SSR, que muestra las relaciones genéticas entre especies de <i>Rubus</i> . <i>R. pringlei</i> (Rpri), <i>R. aff. Liebmannii</i> (A-RI), <i>R. aff. glaucus</i> (A-Rg), <i>R. eriocarpus</i> (Re), <i>R. adenotrichus</i> (Ra), <i>R. glaucus</i> (Rg), <i>R. sapidus</i> (Rs), <i>R. Vigas comercial</i> (Rcv), <i>R. niveus</i> , <i>R. trilobus</i> (Rt) y <i>R. parviflorus</i> (Rp).....	74
Figura 31. Dendrogramas de relaciones entre especies de <i>Rubus</i> obtenidos mediante A) análisis morfológico y B) análisis molecular. <i>R. pringlei</i> (Rpri), <i>R. aff. Liebmannii</i> (ARl), <i>R. aff. glaucus</i> (ARg), <i>R. eriocarpus</i> (Re), <i>R. adenotrichus</i> (Ra), <i>R. glaucus</i> (Rg), <i>R. sapidus</i> (Rs), <i>R. Vigas comercial</i> (Rcv), <i>R. niveus</i> , <i>R. trilobus</i> (Rt) y <i>R. parviflorus</i> (Rp).	90

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño a mi amada mamá. Y a los amigos que elegí para que fueran mi familia en el tiempo que pasé en Chapingo.

Y espero no permitirme olvidar que "Si nunca dejo de ver las cosas con asombro, nunca dejaré de aprender".

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia extendiendo mi gratitud a la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme continuar con mi desarrollo académico y profesional, permitiéndome hacer uso de las instalaciones para mi desarrollo durante mi formación en la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, agradezco profundamente el financiamiento proporcionado durante esta investigación, así como al Instituto de Horticultura.

Agradezco sinceramente a los miembros de mi Comité Asesor por su paciencia y el apoyo brindado en la realización de esta investigación: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano, Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego y Dr. Carlos Alberto Núñez Colín.

A todo el personal de la UACH, quienes me ofrecieron su valiosa ayuda a lo largo de este proceso.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Diana Yaret Tierrablanca Plaza
Fecha de nacimiento	Julio 11 1992
Lugar de nacimiento	Celaya, Guanajuato.
CURP	TIPD920711MGTRLN04
Cédula profesional	13820316



Desarrollo académico

Licenciatura	Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, Universidad de Guanajuato, Celaya-Salvatierra
--------------	---

RESUMEN GENERAL

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Rubus* spp.

El estudio de *Rubus* spp. es esencial por su valor económico, diversidad genética y papel en la restauración de ecosistemas. No obstante, su complejidad taxonómica, atribuida a la poliploidía, hibridación y apomixis, demanda un enfoque multidisciplinario. Este trabajo analizó 11 genotipos de *Rubus* spp. recolectados en Chiapas, Veracruz, Hidalgo y Texcoco, combinando métodos taxonómicos, morfológicos, citogenéticos y moleculares para evaluar su diversidad y evolución. Los análisis taxonómicos y morfológicos identificaron ocho genotipos a nivel de especie y dos con afinidades a la especie, basado en características de estructura foliar. Características que agruparon los genotipos en cuatro clústeres, donde se observó variabilidad entre y dentro de los clústeres. Los análisis citogenéticos revelaron niveles de ploidía que variaron desde diploides ($2n = 14$) hasta dodecaploides ($2n = 84$), en el caso de *Rubus sapidus*, destacando la complejidad cromosómica del género. Las longitudes cromosómicas variaron entre $0.032 \mu\text{m}$ en *Rubus pringlei* y $0.175 \mu\text{m}$ en genotipos relacionados con *Rubus glaucus*, sin correlación significativa entre ploidía y longitud del cromosoma. Los análisis moleculares con marcadores ISSR y SSR revelaron alto polimorfismo genético: 204 bandas polimórficas (100% de polimorfismo) en ISSR y 596 alelos en SSR. Los iniciadores UBC855 y CGA (ISSR) y los loci *Rubus* 16a y *Rubus* 98d (SSR) fueron los más informativos. El análisis PCA y los dendrogramas reafirmaron los patrones de agrupamiento morfológico y revelaron subpoblaciones en *Rubus glaucus*. Este estudio demuestra la importancia de integrar herramientas morfológicas, citogenéticas y moleculares para superar los desafíos taxonómicos de *Rubus* spp. Los resultados subrayan la relevancia evolutiva de la poliploidía y la hibridación, sentando bases sólidas para la conservación, el mejoramiento genético y el desarrollo de cultivares resilientes.

Palabras clave: Apomixis, especiación, poliploidía, variabilidad genética.

GENERAL ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY OF *Rubus* spp.

The study of *Rubus* spp. is essential due to its economic value, genetic diversity, and role in ecosystem restoration. However, its taxonomic complexity, attributed to polyploidy, hybridization, and apomixis, requires a multidisciplinary approach. This study analyzed 11 genotypes of *Rubus* spp. collected in Chiapas, Veracruz, Hidalgo, and Texcoco, combining taxonomic, morphological, cytogenetic, and molecular methods to assess their diversity and evolution. Taxonomic and morphological analyses identified eight genotypes at the species level and two with affinities to a species, based on leaf structure characteristics. These characteristics grouped the genotypes into four clusters, where variability was observed both between and within clusters. Cytogenetic analyses revealed ploidy levels ranging from diploid ($2n = 14$) to dodecaploid ($2n = 84$) in the case of *Rubus* *sapidus*, highlighting the chromosomal complexity of the genus. Chromosome lengths ranged from 0.032 μm in *Rubus* *pringlei* to 0.175 μm in genotypes related to *Rubus* *glaucus*, with no significant correlation between ploidy and chromosome length. Molecular analyses using ISSR and SSR markers revealed high genetic polymorphism: 204 polymorphic bands (100% polymorphism) in ISSR and 596 alleles in SSR. The UBC855 and CGA primers (ISSR) and the Rubus 16a and Rubus 98d loci (SSR) were the most informative. PCA analysis and dendrograms reinforced morphological grouping patterns and revealed subpopulations in *Rubus* *glaucus*. This study demonstrates the importance of integrating morphological, cytogenetic, and molecular tools to overcome the taxonomic challenges of *Rubus* spp. The results highlight the evolutionary significance of polyploidy and hybridization, laying a solid foundation for conservation, genetic improvement, and the development of resilient cultivars.

Keywords: Apomixis, speciation, polyploidy, genetic variability

Master of Science in Agriculture Biotechnology Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Diana Yaret Tierrablanca Plaza

Director: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos años, la producción de zarzamora en México ha mostrado un crecimiento constante, posicionando al país como el principal productor a nivel mundial. Actualmente, se produce un promedio anual de 222,608 toneladas, con un valor económico aproximado de 4,967 millones de pesos. Este notable aumento es destacable, ya que antes de 2016 la producción no superaba las 154,000 toneladas. Hoy en día, la zarzamora se cultiva en doce estados de la República, siendo Michoacán el líder indiscutible al concentrar el 97 % del total de la producción nacional (Gobierno de México, 2022; Zamora Torres et al., 2023).

Gracias a su diversidad geográfica y climática, México ha logrado consolidarse como un actor clave en los mercados internacionales de frutas. En el ámbito global, el país ocupa el primer lugar en producción de aguacate y zarzamora, el segundo en limón y frambuesa, y el tercero en fresa (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022).

El mercado de exportación de zarzamora ha crecido significativamente, alcanzando 31 países como destinos principales. Entre los principales importadores destacan Alemania, Canadá, Holanda, Francia y el Reino Unido, países caracterizados por su alto poder adquisitivo, generando ingresos superiores a los 400 millones de dólares anuales. Sin embargo, Estados Unidos se mantiene como el principal consumidor, importando más de 65,000 toneladas de este fruto. Este panorama abre grandes oportunidades económicas, aumentando los ingresos de los productores que apuestan por este cultivo (SIAP, 2021; Coronado et al., 2014).

La zarzamora se ha convertido en un fruto altamente demandado, no solo por su valor económico, sino también por sus beneficios para la salud, lo que ha impulsado numerosos estudios científicos y tecnológicos. Entre sus propiedades, se destacan su capacidad para prevenir y tratar el síndrome metabólico, los

trastornos inflamatorios, las enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer gastrointestinal (Romero-Luna et al., 2022).

Este fruto es considerado un alimento funcional gracias a su riqueza en vitaminas, minerales y compuestos esenciales como el ácido fólico y la niacina. Además, contiene altos niveles de antocianinas, flavonoides y taninos, reconocidos por sus propiedades antioxidantes que contribuyen al bienestar humano (Coronado, 2014; De Carvalho et al., 2010).

Sin embargo, el crecimiento de la demanda de zarzamoras plantea desafíos significativos, como el impacto del cambio climático y la necesidad de prácticas agrícolas sostenibles. Esto ha llevado a los obtentores de plantas a desarrollar variedades con mayor adaptabilidad a diversas condiciones climáticas y geográficas (Jennings, 1988).

El género *Rubus* es uno de los más diversos dentro de la familia Rosaceae, con más de 750 especies distribuidas principalmente en regiones templadas y subtropicales del mundo (Jennings, 1988). Estas especies no solo tienen un valor económico y ecológico significativo, sino que también desempeñan un papel crucial en la rehabilitación de suelos y ecosistemas degradados. Sin embargo, su identificación taxonómica presenta grandes retos debido a su compleja historia evolutiva, caracterizada por procesos como la hibridación frecuente, la apomixis y la poliploidía, que dificultan establecer límites claros entre especies (Alice & Campbell, 1999).

Tradicionalmente, la caracterización de *Rubus* se ha basado en estudios morfológicos, considerando rasgos como el tamaño y la forma de las hojas, el color y la estructura de las frutas, y la disposición de las espinas y flores (Graham & Woodhead, 2009). Sin embargo, este enfoque a menudo es insuficiente para resolver las relaciones taxonómicas debido a la plasticidad fenotípica y la superposición de características entre especies (Evans & Campbell, 2002).

Para complementar estos estudios, la citogenética ha proporcionado herramientas valiosas para entender la diversidad y evolución del género. En

Rubus la poliploidía es común, con niveles de ploidía que varían desde diploides ($2n = 2x$) hasta dodecaploides ($2n = 12x$). La caracterización del número cromosómico y la organización genómica ha permitido identificar patrones evolutivos y clarificar relaciones filogenéticas (Thompson, 1995; Meng & Finn, 2002).

Además, los marcadores moleculares han emergido como herramientas indispensables para el estudio de *Rubus*. Técnicas como los ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) y los SSR (Simple Sequence Repeats) se utilizan ampliamente para analizar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas dentro del género. Los ISSR generan perfiles polimórficos útiles para estudios de variabilidad genética (Graham et al., 2004), mientras que los SSR, por ser marcadores codominantes altamente específicos, son ideales para identificar cultivares, evaluar poblaciones naturales y analizar eventos de hibridación (Bornet & Branchard, 2001). Por ejemplo, Lebedev et al. (2019) utilizaron SSR para evaluar la diversidad genética de poblaciones de *Rubus* en México, destacando su aplicabilidad en la identificación de variedades adaptadas a diferentes condiciones ecológicas.

En conjunto, los estudios morfológicos, citogenéticos y moleculares en *Rubus* spp. son esenciales para comprender la compleja estructura genética y evolutiva de este género. Estas herramientas integradas no solo contribuyen al mejoramiento genético de cultivares, sino también a la conservación de especies silvestres y al entendimiento de procesos evolutivos fundamentales.

Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo analizar la diversidad genética de 11 accesiones de *Rubus* spp. El documento se estructuró en tres secciones principales: en la primera, se aborda el análisis taxonómico y citogenético de accesiones recolectadas en Veracruz, Chiapas, Hidalgo y Texcoco; en la segunda, se examina la diversidad molecular mediante el uso de marcadores ISSR y SSR; y en la tercera, se realiza una comparación de los resultados moleculares y morfológicos para ofrecer una visión integral de la diversidad genética en este género.

1.1 Literatura citada

- Alice, L. A., & Campbell, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86(1), 81–97.
- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Marcadores de repetición de secuencias simples (ISSR) no anclados: herramientas reproducibles y específicas para la identificación de huellas genómicas. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 209–215. <https://doi.org/10.1007/BF02772892>
- Coronado, M., García, M., Santiago, V., Córdova, A., & Vásquez, R. (2014). La zarzamora, un mercado potencial para los productores agropecuarios de La Sierra de Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 34, 784–794.
- De Carvalho, T., Thomsen, M., & Clark, J. (2010). Commercial fresh blackberry shipping market growth and price trends in the United States. *Small Fruit News*, 10(2), 8–10.
- Evans, R., & Campbell, C. (2002). The origin of the gynoecium in the Rosaceae: Insights from evolutionary developmental biology. *International Journal of Plant Sciences*, 163(5), 753–763. <https://doi.org/10.1086/342441>
- Gobierno de México. (2022). *Zarzamora, la frutilla número uno de México*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/zarzamora-la-frutilla-numero-uno-de-mexico?idiom=es>
- Graham, J., Woodhead, M. (2009). Raspberries and blackberries: The genomics of *Rubus*. In K. M. Folta, & S. E. Gardiner (Eds) *Genetics and genomics of Rosaceae. Plant genetics and genomics: Crops and models*, 6. Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_24.
- Jennings, D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: Their breeding, diseases and growth*. Academic Press.

- Lebedev, V., Subbotina, N., Maluchenko, O., Krutovsky, K., & Shestibratov, K. (2019). Assessment of genetic diversity in differently colored raspberry cultivars using SSR markers located in flavonoid biosynthesis genes. *Agronomy*, 9(9), Article 518. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090518>
- Meng, R., & Finn, C. (2002). Determining ploidy level and nuclear dna content in *Rubus* by flow cytometry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(5), 767-775. <https://doi.org/10.21273/JASHS.127.5.767>
- Romero-Luna, H., Basurto, R., Jimenez, M., Tijera, M., & Peredo-Lovillo, A. (2022). Uso de zarzamora (*Rubus* spp.) como ingrediente funcional en alimentos: potencial aprovechamiento de zarzamora silvestre. In B. Pérez Armendáriz, R. I. Ortiz Basurto, M. Jiménez Fernández, & G. A. Cardoso Ugarte (Eds.), *Aprovechamiento integral de recursos agroalimentarios, para potenciar la economía circular* (pp.183-198). Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). *Frutas una delicia del campo mexicano*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/frutas-una-delicia-del-campo-mexicano?idiom=es#:~:text=Las%20principales%20frutas%20cultivadas%20en,%2C%20pl%C3%A1tano%2C%20aguacate%20y%20mango.&text=Tropicales%20y%20subtropicales%3A,2020%20fue%20de%2010%2C317%2C667%20toneladas>.
- SIAP. (2021). México es el “Número Uno” gracias a la zarzamora. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/mexico-es-el-numero-uno-gracias-a-la-zarzamora>.
- Thompson, M. (1995). Chromosome numbers of *Rubus* species at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience*, 30(7), 1447–1452. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.7.1447>

Zamora, A., Báez, I., & Marín, R., (2023). La producción de la zarzamora en México: Un análisis de rentabilidad y ventaja comparativa. *Inquietud Empresarial*, 23(1), Article e15333. <https://doi.org/10.19053/01211048.15333>

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA, MORFOLÓGICA Y NIVEL DE PLOIDÍA DE GENOTIPOS DE *Rubus* spp.

RESUMEN

En este estudio se analizaron 11 genotipos de *Rubus* spp. recolectados en México, con el objetivo de evaluar su diversidad taxonómica, morfológica y citogenética. Mediante claves taxonómicas de Flora Mesoamericana, se identificaron ocho genotipos a nivel especie y dos con afinidad a especies del género. La caracterización morfológica, basada en variables como tricomas, pubescencia y nervaduras, permitió agrupar a los genotipos en cuatro clústeres principales. Estos resultados resaltan la utilidad de los descriptores morfológicos para la clasificación *ex situ*, a pesar de las variaciones ambientales. En el análisis citogenético, se aplicó la técnica de aplastado para determinar el número y la longitud de cromosomas en metafase. Los niveles de ploidía variaron desde diploides ($2n = 14$) hasta dodecaploides ($2n = 84$). *Rubus niveus* fue identificado como hexaploide ($2n = 42$), mientras que *Rubus sapidus* destacó como dodecaploide. La longitud cromosómica osciló entre $0.032\ \mu\text{m}$ en *R. pringlei* y $0.175\ \mu\text{m}$ en un genotipo afín a *R. glaucus*, sin correlación significativa entre longitud y número de cromosomas. Adicionalmente, el análisis de coordenadas principales evidenció una separación consistente entre los grupos definidos en el dendrograma, lo cual confirmó la diferenciación entre genotipos en términos morfológicos y citogenéticos. Estos resultados subrayaron la importancia de integrar métodos taxonómicos, morfológicos y citogenéticos para comprender la diversidad de *Rubus* spp., para facilitar su conservación y mejoramiento genético. La poliploidía y la hibridación se destacaron como mecanismos clave en la evolución del género, lo que evidenció la necesidad de profundizar en su análisis genético en diferentes regiones del país.

Palabras clave: Análisis genético, citogenética, clasificación *ex situ*, descriptor morfológico.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Diana Yaret Tierrablanca Plaza

Dirección: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

CHAPTER II. TAXONOMIC, MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION AND PLOIDY LEVEL OF *Rubus* spp. GENOTYPES

ABSTRACT

This study 11 genotypes of *Rubus* spp. were analyzed, collected in Mexico, aiming to evaluate their taxonomic, morphological, and cytogenetic diversity. Using the “Flora Mesoamericana” keys, eight specific genotypes and two with affinities to species of the genus were identified. Morphological characterization, based on variables such as trichomes, pubescence, and venation, grouped the genotypes into four main clusters, as shown by a dendrogram generated using the UPGMA method. These results highlight the utility of morphological descriptors for *ex situ* classification, despite environmental variations. In the cytogenetic analysis, the squash technique was applied to determine chromosome number and length in the metaphase stage. Ploidy levels ranged from diploid ($2n = 14$) to dodecaploid ($2n = 84$). *Rubus niveus* was identified as hexaploid ($2n = 42$), while *Rubus sapidus* stood out as dodecaploid. Chromosome length varied from $0.032\ \mu\text{m}$ in *R. pringlei* to $0.175\ \mu\text{m}$ in a genotype related to *R. glaucus*, with no significant correlation between chromosome length and number. Additionally, the principal coordinate analysis revealed consistent separation among the groups defined in the dendrogram, confirming the differentiation between genotypes in terms of morphological and cytogenetic characteristics. These findings underscore the importance of integrating taxonomic, morphological, and cytogenetic methods to understand the diversity of *Rubus* spp., facilitating their conservation and genetic improvement. Polyploidy and hybridization stand out as key mechanisms in the evolution of the genus, highlighting the need for further genetic analysis across different regions of the country.

Keywords: Genetic analysis, cytogenetics, *ex situ* classification, morphological descriptor.

Master of Science in Agriculture Biotechnology Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Diana Yaret Tierrablanca Plaza

Director: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

2.1 INTRODUCCIÓN

En México se ha reportado alrededor de 15 especies silvestres de zarzamora (*Rubus* spp.) distribuidas en el territorio nacional (Segura et al., 2009). El identificar de manera correcta las diferentes especies de *Rubus* spp. facilitaría el trabajo a la hora de establecer programas de mejoramiento genético, debido a que el género *Rubus* enfrenta algunos de los desafíos taxonómicos más complejos (Iwatsubo & Naruhashi, 1991). Esto se debe, en parte, a la alta incidencia de poliploidía, a la frecuente hibridación y a la apomixis, procesos que determinan que las plantas presenten variaciones genéticas, ya que las plántulas obtenidas son clones de la planta madre. Como consecuencia, las opiniones sobre cuántas especies deben reconocerse en una región determinada pueden variar considerablemente (Standley & Steyermark, 1976).

El género *Rubus* está compuesto por 12 subgéneros y aproximadamente entre 750 y 1,000 especies, siendo de los más diversos tanto en términos morfológicos como genéticos. Incluye una gran variedad de especies silvestres y cultivadas, valoradas principalmente por sus frutos (Cancino-Escalante et al., 2011).

La mayoría de las zarzamoras estudiadas son diploides ($2n=2x=14$) y presentaron autoincompatibilidad, aunque también existen poliploides autocompatibles (Meng & Finn, 2002). La siembra de zarzamora en nuevos entornos ha llevado a la aparición de zarzamoras apomícticas, la hibridación entre estas zarzamoras apomícticas diploides ha dado lugar a poliploides con números cromosómicos de $2n=3x=21$, $2n=4x=28$, $2n=5x=35$, $2n=6x=42$, $2n=7x=49$, $2n=8x=56$ y $2n=12x=84$ (Meng & Finn, 2002). En zarzamoras de Europa, Asia, África y América, la apomixis, el número de cromosomas y el nivel de ploidía se han determinado mediante estudios citológicos, fenotípicos y moleculares (Meng & Finn, 2002).

En las especies diploides, los cromosomas tienen una longitud que oscila entre 1 y 3 μm , con un contenido de ADN entre 0.56 y 0.59 pg. Sin embargo, los genotipos que comparten el mismo número de cromosomas pueden variar en su contenido de ADN y dar lugar a progenies poliploides (Meng & Finn, 2002). La

poliploidía presenta un desafío en la segregación cromosómica, ya que cada cromosoma tiene homólogos. La duplicación completa del genoma o autoploidía desempeña un papel fundamental en la evolución de todas las angiospermas, lo que permite que los híbridos interespecíficos fértiles tengan múltiples copias de alelos para cada locus, liberando genes duplicados de las mutaciones y favoreciendo la especiación con un flujo génico limitado. Además, las cruas heteroploides se utilizan para introducir genes deseables de especies silvestres o materiales élite en cultivos o especies que pueden generar descendencias con diferentes niveles de ploidía (Navajas-Pérez et al., 2006).

Se han establecido algunas colecciones *ex situ* de especies de *Rubus*, compuestas principalmente por material recolectado en campos de agricultores y algunas especies silvestres. No obstante, el conocimiento sobre la diversidad genética de las especies de *Rubus* sigue siendo limitado. Aunque se han realizado algunos estudios en ciertas regiones del país con materiales de *Rubus*, tanto silvestres como cultivados (Marulanda et al., 2007; Morillo et al., 2005; Rodríguez-Bautista et al., 2018, 2019; Zamorano et al., 2007), es necesario expandir el conocimiento sobre colecciones de otros estados del país, que aún no han sido investigadas, y definir mejor las estrategias de conservación, las necesidades adicionales de recolección y el uso del germoplasma en programas de selección y mejoramiento genético.

Por lo anterior en este capítulo el objetivo fue dilucidar la diversidad en la taxonomía de los genotipos para identificar a que especie pertenecen, evaluar la diversidad morfológica y el nivel de ploidía, a través de la técnica de citogenética de aplastado (Delgado et al., 2010).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se estudiaron un total de diez especies silvestres de *Rubus* L. y una variedad comercial, Veracruz Vigas. Estos genotipos fueron recolectados en diversas regiones de México, incluyendo Chiapas, Veracruz, Hidalgo y Texcoco (Cuadro

1). Posteriormente, las accesiones se establecieron bajo condiciones controladas en los invernaderos del Campo Agrícola Experimental del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, garantizando así un manejo adecuado para su evaluación y análisis.

Cuadro 1. Genotipos de *Rubus* spp. utilizados para la identificación taxonómica, clasificación morfológica e identificación citogenética.

Individuo	Código	Procedencia	Tipo
1	Niv	Chiapas	Silvestre
2	1-6	Chiapas	Silvestre
3	2-3	Chiapas	Silvestre
4	3-2	Chiapas	Silvestre
5	3-7	Texcoco	Silvestre
6	4-6	Chiapas	Silvestre
7	5-1	Chiapas	Silvestre
8	5-6	Veracruz Vigas	Comercial
9	6-2	Hidalgo	Silvestre
10	7-1	Veracruz	Silvestre
11	7-2	Chiapas	Silvestre

2.2.2 Identificación taxonómica y clasificación morfológica

La identificación taxonómica de las especies se realizó de manera *ex situ*, utilizando como referencia el “Catálogo de las plantas vasculares nativas de México” de José Luis Villaseñor y las claves de Flora Mesoamericana (Trópicos *Rubus* L., 2015). La confirmación de las especies o de su afinidad taxonómica se llevó a cabo mediante la revisión de especímenes depositados en el Herbario-Hortorio JES, perteneciente a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Para la caracterización morfológica de las accesiones, se registraron un total de 16 variables, seleccionadas con base en descriptores cualitativos establecidos por la UPOV (2006), los cuales fueron adaptados para generar datos binarios que facilitaran su análisis.

Las características morfológicas se clasificaron en dos categorías principales: tallo y hoja. Las variables asociadas al tallo incluyeron: forma redonda, forma

acanalada, presencia de antocianinas en el tallo, antocianinas en los ápices, espinas en el tallo, pubescencia en el tallo, presencia de tricomas glandulares y cerosidad en la superficie del tallo. Por otro lado, las variables foliares consideradas fueron: hojas compuestas, antocianinas en el pecíolo, pubescencia en el haz de la hoja, pubescencia en el envés, torsión de la hoja, rugosidad de la superficie foliar, relieve de venaciones hundido y presencia de espinas en el envés de la hoja.

2.2.3 Identificación citogenética

En el estudio citogenético, debido a que las plantas analizadas eran adultas, se utilizó la técnica de propagación por estaca para obtener el material necesario en óptimas condiciones, asegurando raíces vigorosas. Las plantas se propagaron en condiciones controladas de invernadero, donde se utilizó envases de plástico transparente con capacidad de 1 litro, lo que permitió una observación directa del desarrollo radical adventicio. El sustrato empleado fue una mezcla homogénea de “peat moss”, agrolita y tezontle en una proporción volumétrica 1:1:1. Para estimular el crecimiento radical adventicio, se aplicó el regulador de crecimiento RADIX® 1000, tipo 1.

Una vez que los genotipos presentaron raíces adventicias desarrolladas, se implementó la técnica citogenética de aplastado (Delgado et al., 2010), adaptada con modificaciones específicas para el conteo cromosómico. Se seleccionaron las raíces más vigorosas entre las 10:00 y las 11:00 a.m., horario en el cual las células se encontraban en metafase. Las puntas de las raíces (meristemos), de aproximadamente 5 mm de longitud, se recolectaron inmediatamente y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL con agua destilada a 4 °C, para mantener su viabilidad hasta completar la colecta. Posteriormente, las raíces recolectadas se sometieron a un pretratamiento a 4 °C durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, las muestras se fijaron utilizando líquido de Carnoy. Para ello, las puntas de las raíces se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL, añadiendo la cantidad suficiente de fijador para cubrirlas completamente durante

30 minutos. Finalizado el fijado, las raíces se hidrolizaron para eliminar la pared celular. Este proceso se llevó a cabo utilizando HCl 1N a una temperatura de 60 °C, con un tiempo de exposición de 18 a 20 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada para detener la digestión celular y evitar un daño excesivo en las muestras.

Para el aplanado de las raíces, se utilizó un portaobjetos donde se depositó una gota de 4 µL de ácido acético al 45 %. Sobre esta gota, se colocó una sección de la punta de la raíz, de aproximadamente 3 mm, y se dejó reposar durante 45 segundos. La raíz fue macerada cuidadosamente con un bisturí, desintegrando los fragmentos hasta obtener una dispersión adecuada. A continuación, se añadió a la preparación una solución de orceína acética clorhídrica (15 µL) como colorante, dejándola actuar durante 5 minutos.

La preparación se cubrió con un cubreobjetos, aplicando presión suave con el borrador de un lápiz para extender el material y finalmente realizando una presión uniforme con el pulgar. El exceso de colorante fue eliminado cuidadosamente utilizando sanitas.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico, comenzando con un aumento de 10X para localizar células en metafase adecuadas. Posteriormente, se utilizó un aumento de 40X para seleccionar las células más definidas y, finalmente, el objetivo de inmersión de 100X para capturar fotografías de alta resolución.

2.2.4 ANÁLISIS APLICADOS

Utilizando los datos obtenidos con las claves taxonómicas de Flora Mesoamericana se programó un árbol taxonómico en TreeView X, con base en las coincidencias en las características específicas de cada planta.

A partir de los descriptores morfológicos se generó una matriz binaria para evaluar la similitud utilizando el programa estadístico FREETREE.EXE con el coeficiente de similitud Simple matching (Sokal & Sneath, 1963), y se aplicó el método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética, UPGMA (Sokal & Michener, 1958) y se calculó un remuestreo bootstrap mediante el método de Jackknife usando 1000 repeticiones (Efron, 1979).

En la identificación citogenética se tomaron 50 fotografías por genotipo de células en metafase, el conteo cromosómico fue indirecto mediante el análisis de imagen con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) con el que también se midió la longitud de los cromosomas por célula y se generó un promedio de la longitud.

La longitud promedio de cromosomas y el número de cromosomas se correlacionó mediante el coeficiente de Pearson.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Identificación taxonómica

La evaluación con las claves de Flora Mesoamericana dió paso a la identificación de ocho de los genotipos a nivel de especie y dos con afinidad a especies del género *Rubus*.

El genotipo “Niv, Chiapas” tipo silvestre, identificado como *Rubus niveus* Thunb, (Figura 1) presentó características de porte erguido, ápices verdes claros con pubescencia el tallo robusto, espinoso, cubierto por pruina, en tallos viejos hay presencia de antocianinas; en hoja los peciolo son espinosos al igual que la vena central, pinnadas, foliolos rómbicos de margen dentado, punta aguda, base redondeada, con división de la hoja dimitida, la venación marginal e imperfecta con estipulas adnadas (unidas al peciolo), características que concordaron con lo descrito por George Don (1831); Landázuri (2010); Moreno (1984); WFO (2020).

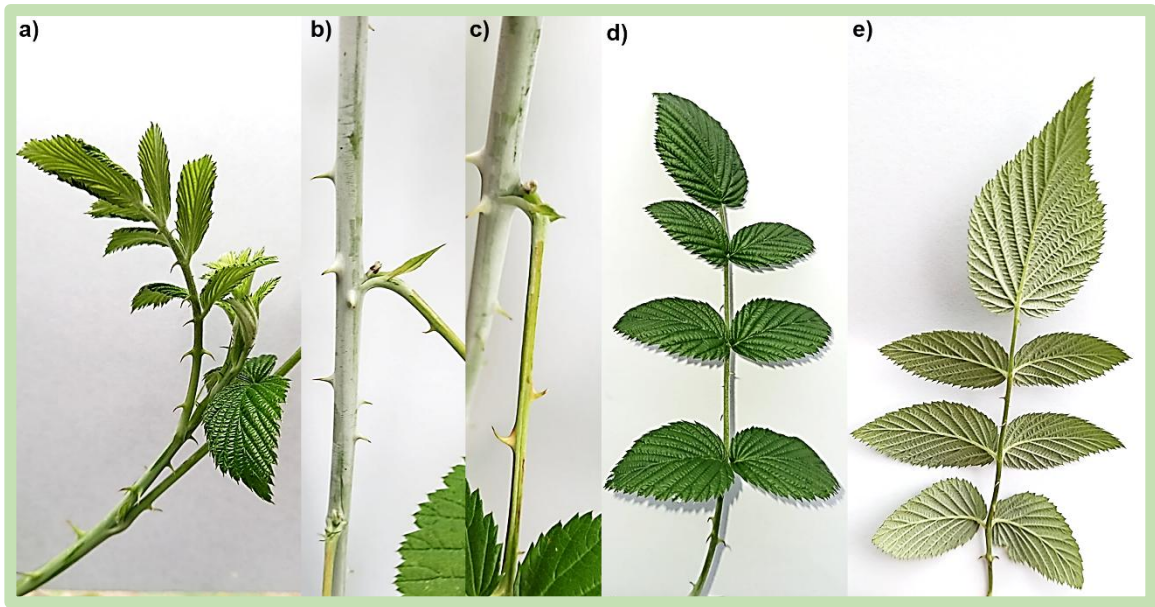


Figura 1. Características vegetativas de *Rubus niveus* Thunb. a) ápice, b) tallo con estipula, c) peciolo, d) haz de hoja y e) envés.

El genotipo “1-6, Chiapas” tipo silvestre, fue identificado como *Rubus glaucus* Benth, (Figura 2) con características que concuerdan a lo descrito por Benthams (1839), Moreno (1984), Rubio et al. (2019). Ápices con presencia de antocianinas, tallos de porte erecto circulares, con numerosas espinas, cubiertos por una capa delgada de pruina, los folios son trifoliados, libres con margen tipo aserrado con ápices caudado, la base de la hoja es obtusa, la división de la hoja es dimitida, con nervación simple, peciolo acanalado y estipulas infrapeciolares. El genotipo “3-2 Chiapas” tipo silvestre, (Figura 3) fue inidentificado como afín a *Rubus glaucus* Rydb. y a diferencia del genotipo 1-6, este tiene un tallo sin pruina, el haz de las hojas es blanco sin pubescencia, presenta tricomas glandulares en el margen de las hojas y las hojas de los ápices se vuelven negras con la sequedad como lo indicado por Benthams (1839).

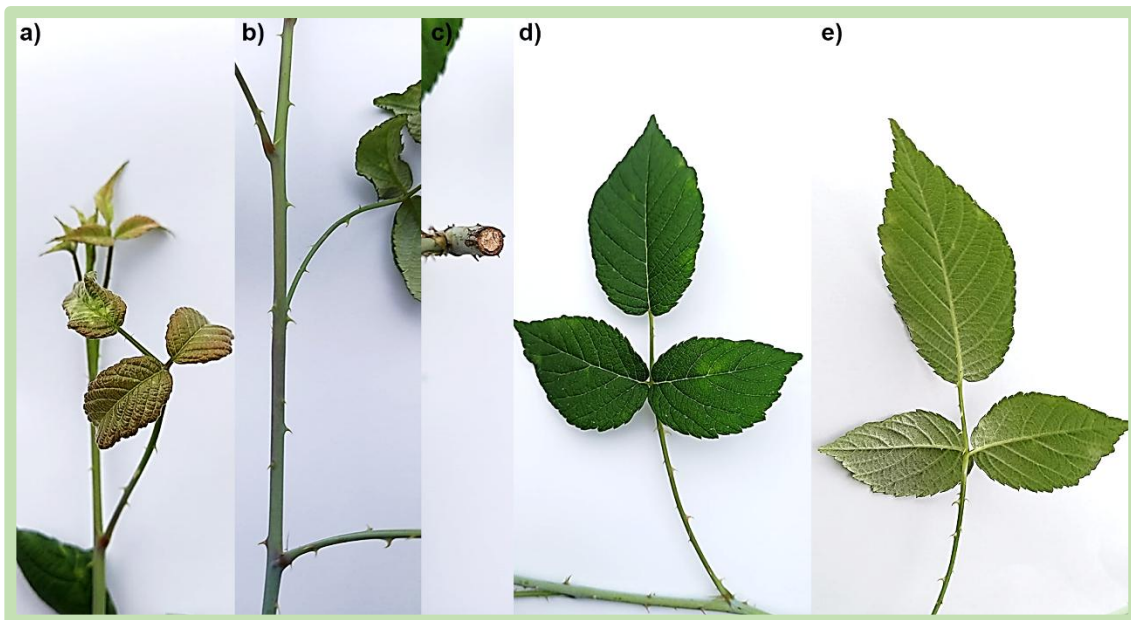


Figura 2. Características vegetativas de *Rubus glaucus* Benth. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.

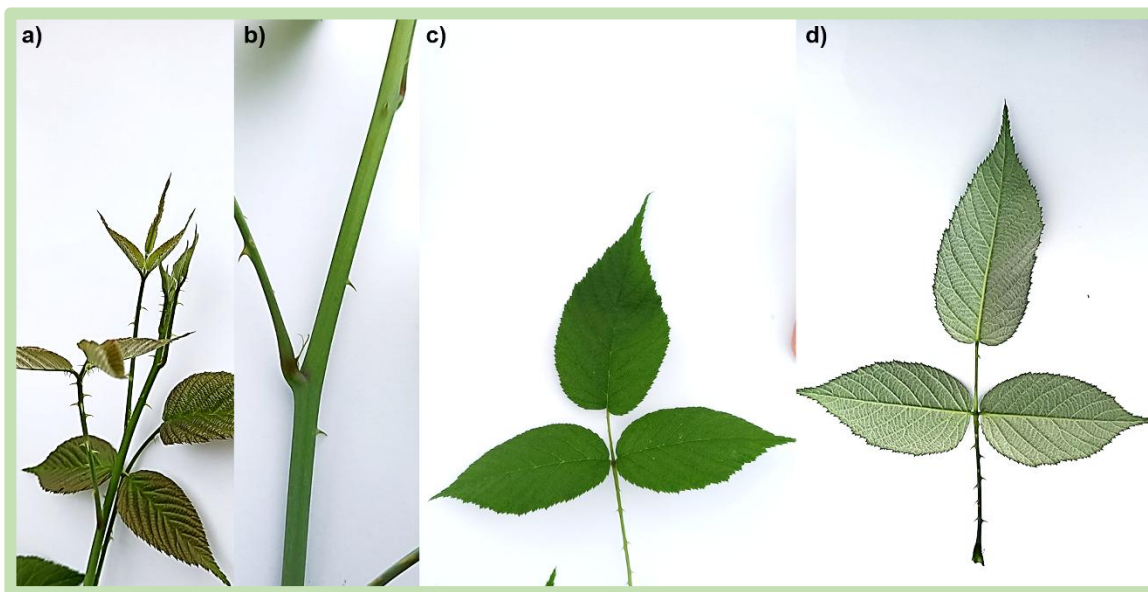


Figura 3. Características vegetativas de *Rubus* aff. *glaucus* Rydb. a) ápice, b) tallo con estipula, c) haz de hoja y b) envés.

El genotipo “2-3, Chiapas” tipo silvestre (Figura 4) fue identificado como *Rubus adenotrichus* Schldl. y presentó los siguientes caracteres vegetativos: ápices sin

presencia de antocianinas y tupidos de tricomas glandulares, de porte suberguido, tallo acanalado, tupido de cerdas glandulares, pubescencia color rojo, las espinas son rojas y falciformes; como características foliares presentó cinco foliolos libres elípticos, nerviación reticulada e imperfecta en la nervación principal con dos a tres espinas en forma de gancho, peciolo acanalado con espinas falciformes y presencia de cerdas glandulares en las estipulas infrapeciolares, cubiertas de tricomas y cerdas glandulares, el margen de las hojas aserrado, el ápice acuminado, base subcordada y la división dimidiada similar a lo encontrado por Schiede y Ehrenbergio (1839); Moreno (1984); Rodríguez-Bautista (2019).

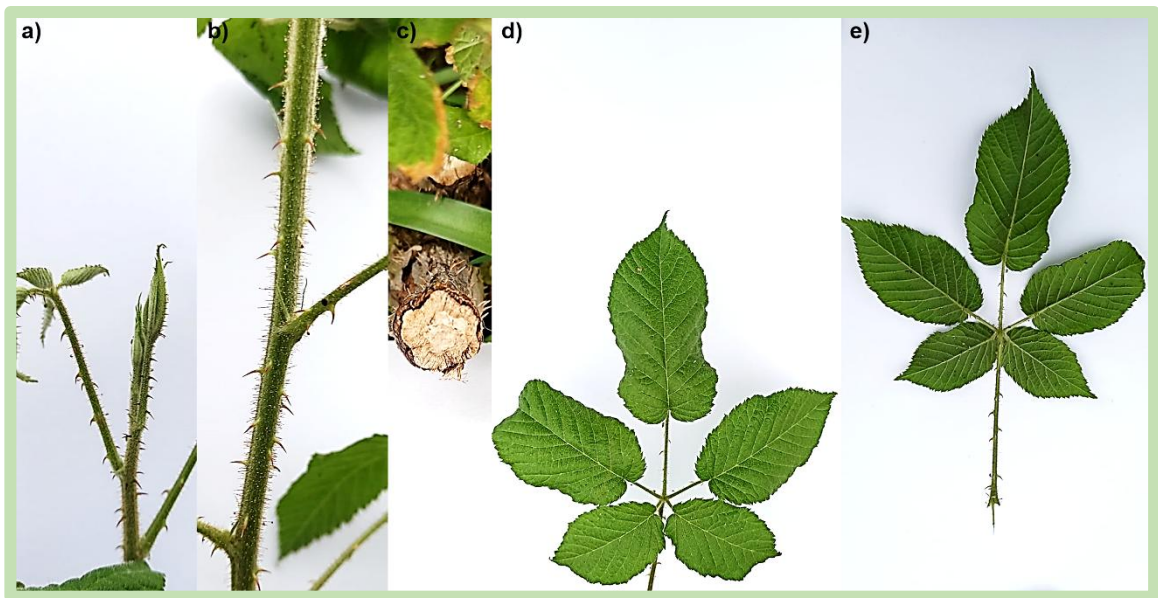


Figura 4. Características vegetativas de *Rubus adenotrichus* Schltdl. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y peciolo, e) envés.

El genotipo “3-7 Texcoco” tipo silvestre, (Figura 5) identificado como afín a *Rubus liebmannii* presentó características que concuerdan con lo descrito por Moreno, 1984; Sánchez-Velázquez et al. (2024); Sociedad de Ciencias Naturales de Bremen (1866). En ápices hubo presencia de antocianinas, con hábito de crecimiento decumbente, tallo circular con espinas rectas, estipulas que surgen en la base del peciolo, peciolo con antocianinas, hojas trifoliadas serruladas, con nerviación simple, ápices aristados y base redondeada.

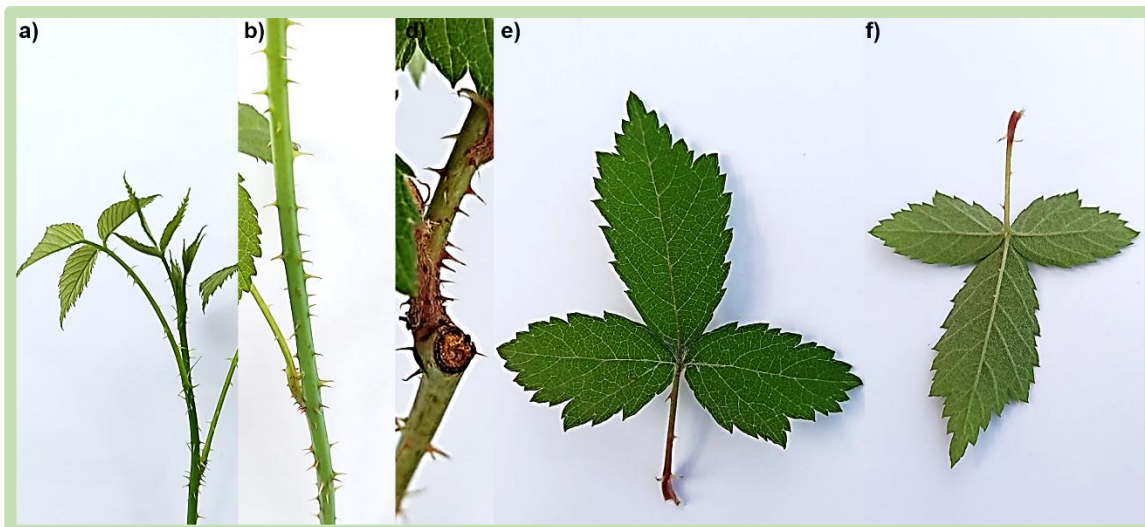


Figura 5. Características vegetativas de *Rubus* aff. *liebmanni*. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.

El genotipo “4-6 Chiapas” tipo silvestre, (Figura 6) inidentificado como *Rubus pringlei* Rydb. mostró características de porte arqueado decumbente, tallo redondo cubierto por pruina, con presencia de antocianinas en el ápice, espinas curvas, estipulas laterales, en hoja peciolo acanalado con espinas, venación simple, ápice de la hoja caudado y base oblicua, como lo indicado por Moreno (1984); New York Botanical Garden (1905); Rodriguez-Bautista et al. (2019).

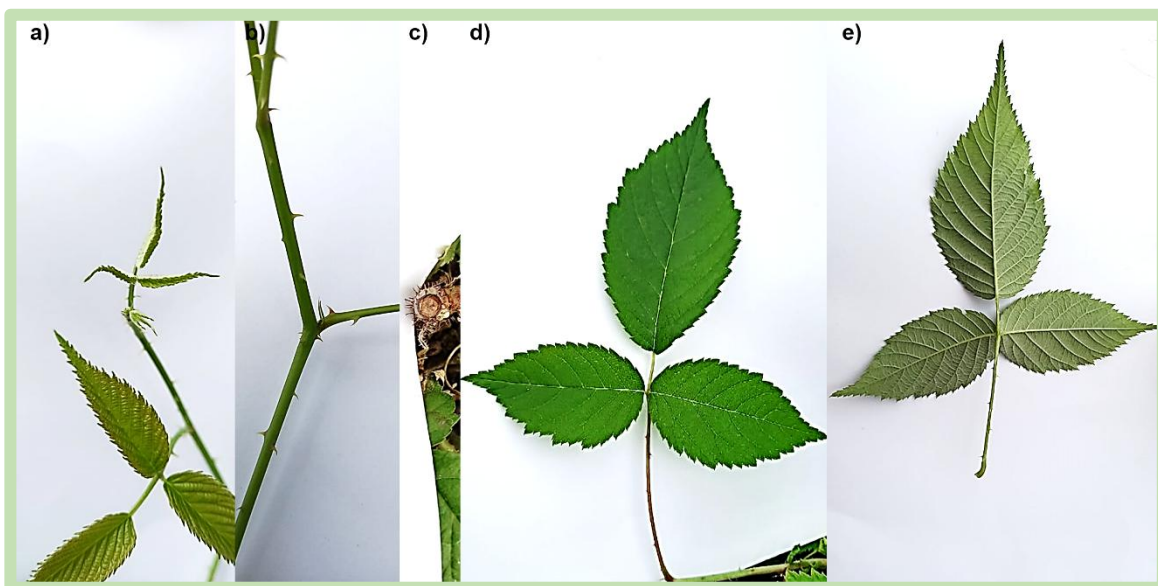


Figura 6. Características vegetativas de *Rubus pringlei* Rydb. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.

El genotipo “5-1 Chiapas” tipo silvestre, (Figura 7) inidentificado como *Rubus eriocarpus* Liebm. presentó características que concuerdan a lo descrito por Moreno (1984) y la Sociedad de Historia Natural de Copenhague (1849): porte arqueado decumbente, tallo cubierto por espinas rectas a curvas, estípulas axilares lineales puntiagudas pubescentes, haz de hojas glandulares-setosos, con margen serrulado y pedúnculos acanalados; Standley & Steyermark (1976) en su obra titulada “Flora de Guatemala” indicaron que esta especie está estrechamente relacionada con *Rubus glaucus* y puede ser solo una forma distinta de esa especie al presentar características similares considerando que *R. eriocarpus* no presenta pruina en el tallo, este es acanalado y en el ápice no hay presencia de antocianinas.

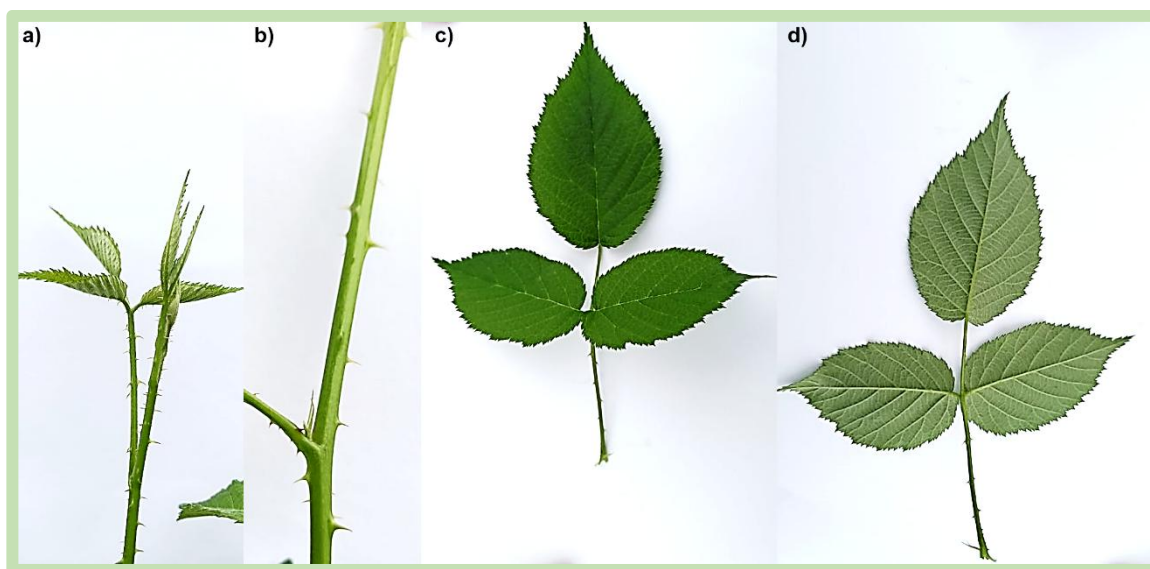


Figura 7. Características vegetativas de *Rubus eriocarpus* Liebm. a) ápice, b) tallo con estípula, c) haz de hoja y pecíolo, d) envés.

El genotipo “5-6 Veracruz” (Figura 8) tipo comercial, mostró características morfológicas similares a los silvestres tales como ápices con presencia de espinas de color rojo, tallos circulares, porte decumbente trepador, pubescentes con espinas rectas, presencia de antocianinas en espinas, folíolos compuestos trifoliados, solapados, cada hoja es trilobulada, con estípula axilar y pecíolos

acanalados, lo que indicó que presenta características muy parecidas a *Rubus ursinus* (Hickman, 1993).

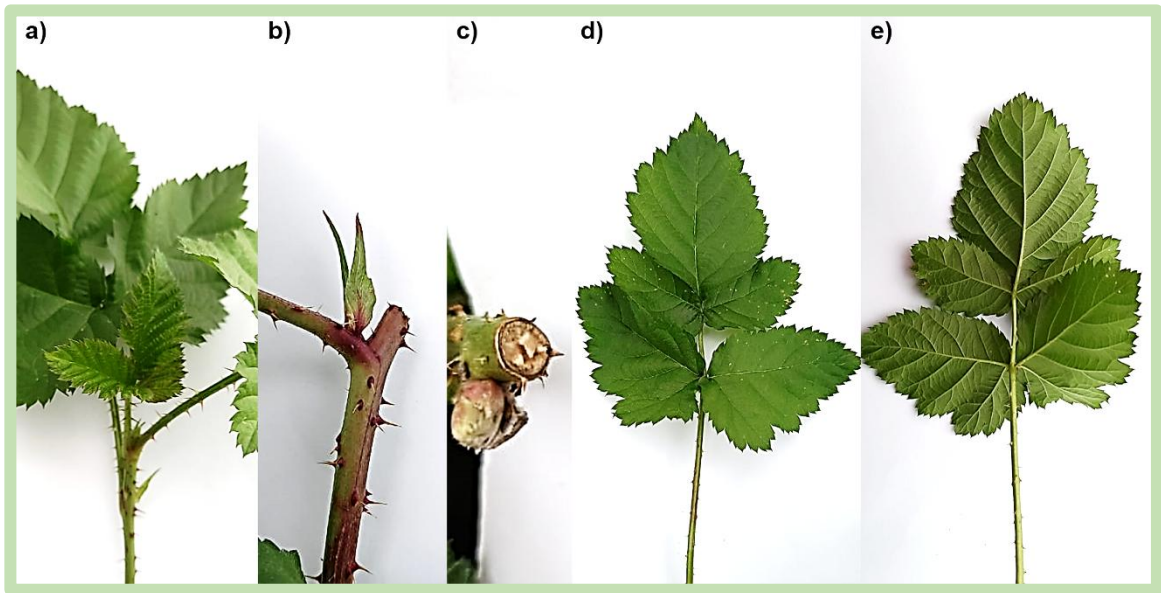


Figura 8. Características vegetativas de *Rubus* variedad comercial a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.

El genotipo “6-2 Hidalgo” tipo silvestre, (Figura 9) inidentificado como *Rubus sapidus* Schltdl. presentó características que concordaron con lo descrito por: Moreno (1984); Rodríguez-Bautista et al. (2019); Smith (1889); WFO (2024). Un arbusto con presencia de antocianinas en el ápice, de porte decumbente a escándete, con tallos acanalados armados con numerosas espinas falciformes, foliolos trifoliados, hojas ovadas o elípticas, el color del haz verde brillante con poca pubescencia, en el envés es verde-oliva glabro, los márgenes serrados, la base atenuada, ápice acuminado, el peciolo presenta espinas falciformes, con estípulas lineales a lanceoladas pilosas.

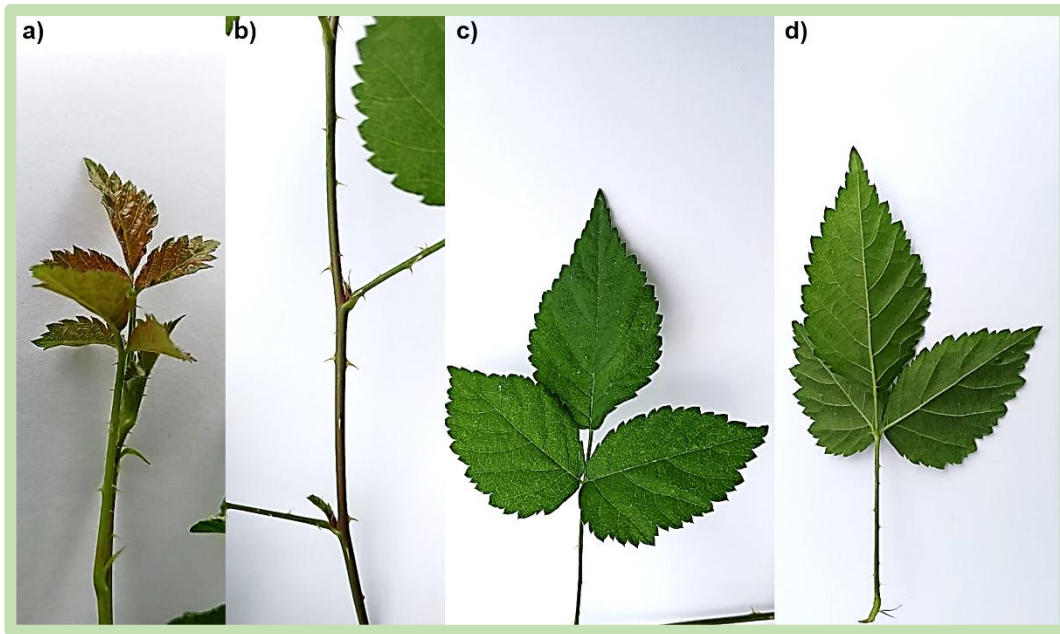


Figura 9. Características vegetativas de *Rubus sapidus* Schltdl. a) ápice, b) tallo con estipula, c) haz de hoja y pecíolo, d) envés.

El genotipo “7-1 Veracruz” (Figura 10) tipo silvestre, identificado como *Rubus trilobus* Focke. presentó características que concodaron con lo descrito por el Donnel Smith (1893); García-Mendoza & Meave (2011); Moreno (1984); Niembro et al. (2010); Standley & Steyermark (1946). Con presencia de pubescencia en ápices, porte erecto, no presenta enraizamiento en las puntas, tallos redondos sin espinas, leñoso escamoso, con yema desnudas pilosas, las hojas anchas con tres lóbulos terminales, pubescentes, dentadas con ápice agudo, base hendida, los peciolo acanalados con pubescencia y presencia de antocianinas, estipulas ocreadas y pubescentes.

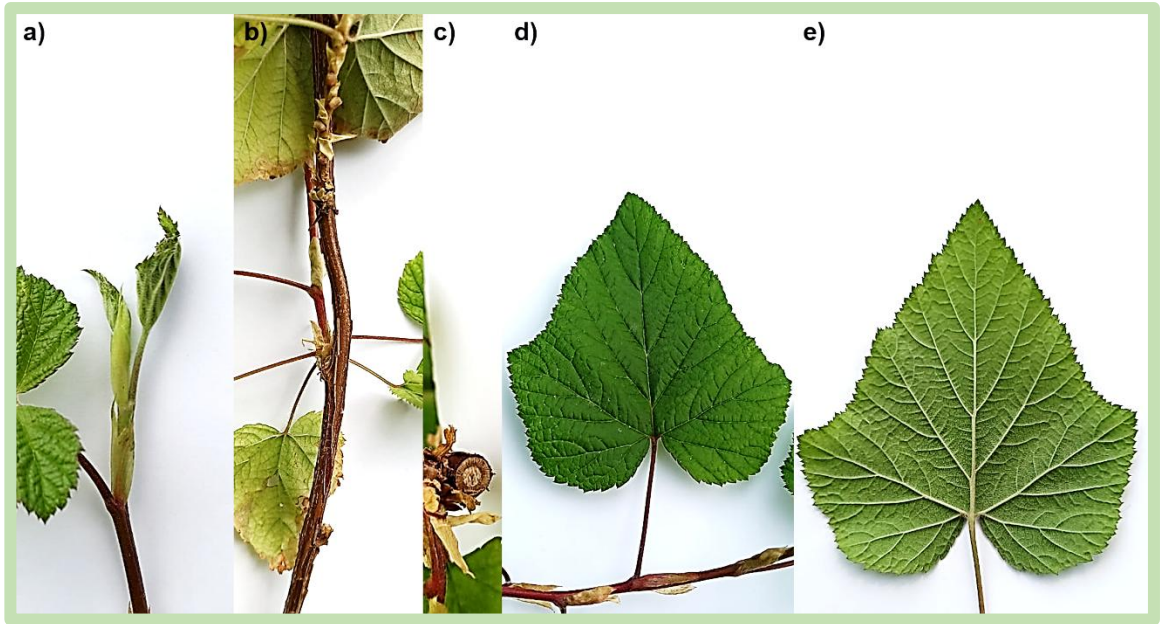


Figura 10. Características vegetativas de *Rubus trilobus* Focke. a) ápice, b) tallo, c) sección transversal de tallo, d) haz de hoja y pecíolo con estipula, e) envés.

El genotipo “7-2 Chiapas” tipo silvestre, (Figura 11) fue inidentificada como *Rubus parviflorus* Nuez. Se observaron características que coincidieron a lo descrito por Fassett (1994); Lawrence (2012); Nuttall (1818): con pubescencia en ápices de porte erecto, sin enraizamiento en las puntas, tallos circulares, finamente pilosos, con glándulas pecioladas. Las hojas son simples palmática con 5 lóbulos, dentada abierta, ápice agudo, base subcordada, con fina pilosa grisácea, peciolo abrazadores y estipulas infrapeciolares.

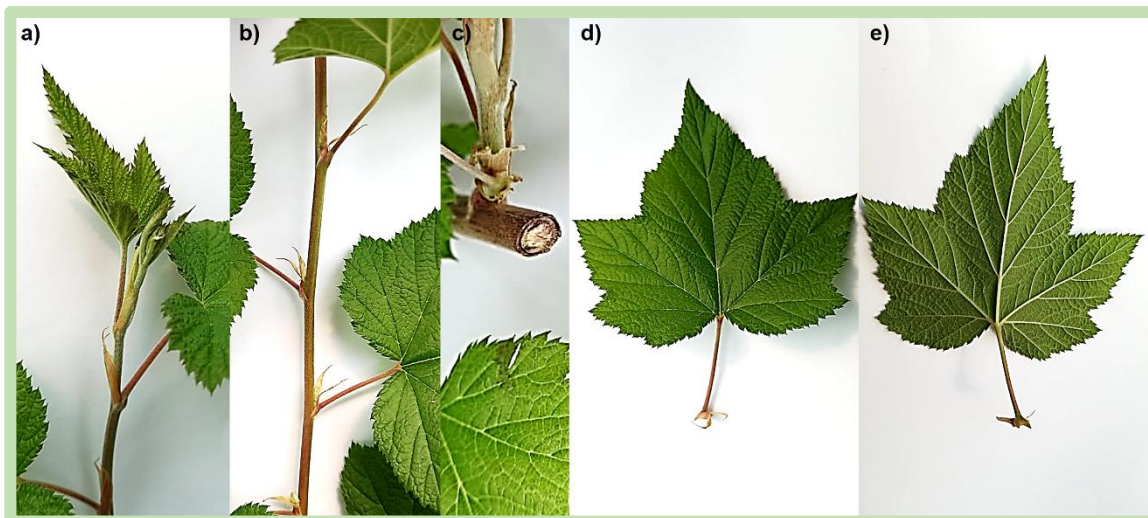


Figura 11. Características vegetativas de *Rubus parviflorus* Nuez. a) ápice, b) tallo con estipula, c) sección transversal del tallo d) haz de hoja y pecíolo, e) envés.

Datos obtenidos de las características evaluadas (Cuadro 2), dieron como resultado el árbol taxonómico (Figura 12), en el que se puede observar los grupos formados conforme a la similitud entre las especies evaluadas según las claves morfológicas de la Flora Mesoamericana (Tropicos *Rubus* L., 2015). El árbol taxonómico se dividió en cuatro grupos principales. El primer grupo se formó con las especies *R. trilobus*, *R. parviflorus*, *R. Veracruz Vigas* y *R. adenotrichus*; donde todas las especies tienen en común la presencia de tricomas en el tallo. El grupo antes mencionado mostró un 40 % de similitud con un segundo grupo integrado por las especies *R. glaucus* Benth y *R. aff. glaucus* Rydb similares entre sí en un 98 % de las características, excepto porque en la ARg hay presencia de tricomas glandulares en el envés de la hoja. Finalmente, un tercer grupo compuesto por *R. pringlei*, *R. eriocarpus* y *R. niveus* mostró un 57 % de similitud con el cuarto grupo estructurado por *R. sapidus* y *R. aff. liedmannii*.

Los grupos uno y dos en conjunto tienen un 60 % de similitud respecto a los grupos tres y cuatro.

Es importante mencionar que algunas de las características evaluadas no son homogéneas y normalmente varían dentro de una misma especie crecida en

ambientes diferentes, por lo que la evaluación con claves morfológicas para la identificación *ex situ* de especies suele ser más compleja (Xiong et al., 2019); sin embargo, los resultados se pueden apoyar en la revisión de Lu y Boufford (2003) y Lu y Yu (1985), en la que hicieron identificación taxonómica de *R. xanthocarpus*, en función de sus estípulas y las bases del peciolo.

Cuadro 2. Características diferenciales de *Rubus* spp. silvestres.

Características			Especies
Plantas inermes	Tallo glabrescente	Sin enraizamiento en puntas	<i>Rubus trilobus</i>
Hojas simples palmeadas	Tallo puberulento		<i>Rubus parviflorus</i>
Foliolo con venas prominentes	Tallo puberulento finamente pilosos		<i>Rubus Veracruz Vigas</i>
Foliolo con venas prominentes	Tallos con tricomas glandulares rojos		<i>Rubus adenotrichos</i>
Haz de foliolo glabro y en el envés blanco tomentoso	Tallos glauco-pruinoso	Estípulas setáceas	<i>Rubus glaucus</i> <i>Rubus aff. glaucus</i>
Haz de los folíolos puberulento y en el envés blanco tomentoso	Hojas ternadas, estipulas largas	Peciolos, peciolulos y venas centrales espinosos.	<i>Rubus pringlei</i>
Haz de hojas glandulares-setosos	Tallo cubierto por espinas rectas a curvas	Estipulas que surgen en la base del peciolo	<i>Rubus eriocarpus</i>
Hojas pinnaticompuestas	Tallos glaucos-pruina	Corola rosada a purpura; frutos maduros purpura intenso	<i>Rubus niveus</i>
Tallos, pedúnculos y pedicelos glabrescentes	Tallo angular con espinas falciformes	Porte de la planta rastrera	<i>Rubus sapidus</i>
Tallos, pedúnculos y pedicelos glabrescentes	Foliolos con margen aserrado	Estipulas que surgen en la base del peciolo	<i>Rubus aff. liebmannii</i>

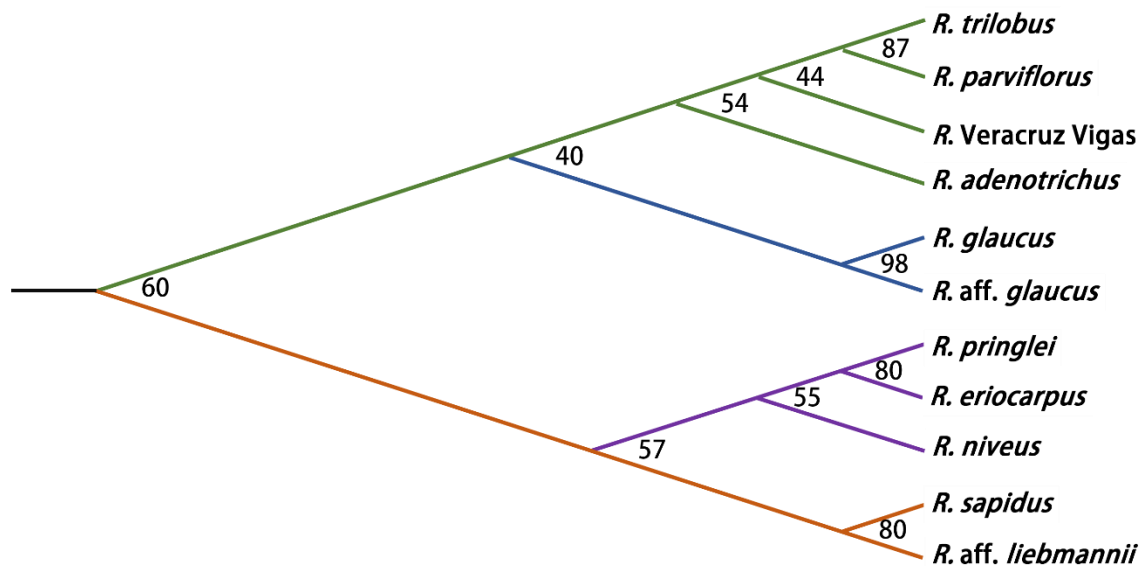


Figura 12. Árbol taxonómico de las 11 especies de *Rubus* spp.

Además, en el dendrograma para determinar relaciones entre las especies evaluadas (Figura 13), resultó en la formación de cuatro grupos principales. Un primer grupo (el más grande) se formó con cuatro genotipos: *R. aff. glaucus*, *R. pringlei*, *R. aff. liebmanni* y *R. glaucus*. El segundo grupo se integró con *R. eriocarpus* y *R. sapidus*. Un tercer grupo compuesto por *R. niveus*, la variedad comercial Veracruz Vigas, *R. adenotrichos* y finalmente el cuarto con *R. parviflorus* y *R. trilobus*.

Los grupos formados y las relaciones establecidas entre las especies sugieren que todas las características cualitativas evaluadas proporcionaron información adecuada, lo que concordó con lo encontrado por Xiong et al. (2019), quienes mencionaron que las variaciones observadas en las diferentes características proporcionan información útil para la delimitación de especies y como tal no se puede identificar una característica como la más importante para la determinación de un grupo.

Adicionalmente, a pesar de que la mayoría de los genotipos fueron colectados en un solo lugar (Chiapas), los descriptores cualitativos utilizados permitieron generar grupos bien definidos y diferenciados, lo que sugiere que pueden ser

utilizados de manera confiable para la evaluación de materiales promisorios tal como lo mencionaron Cancino-Escalante et al. (2011).

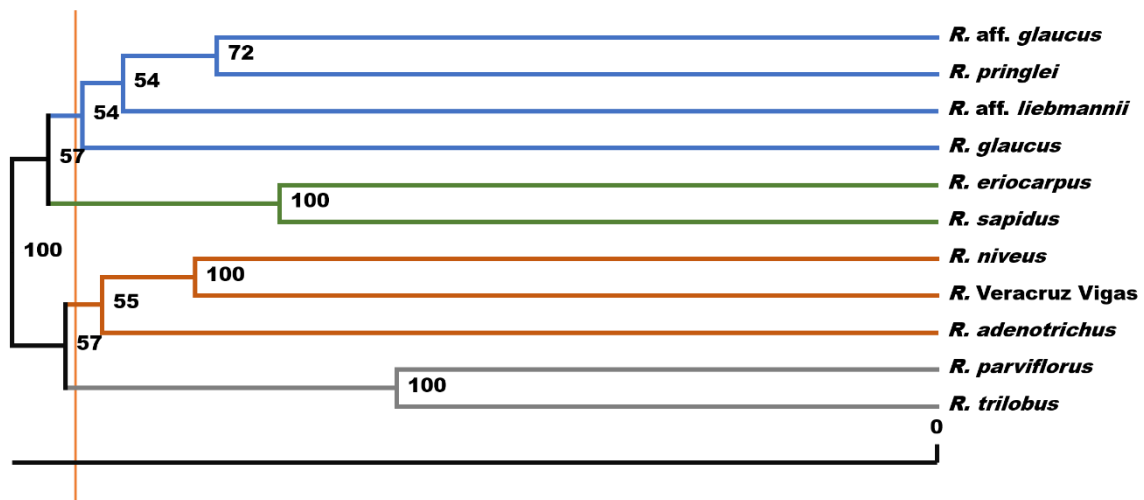


Figura 13. Agrupamiento de las 11 especies de *Rubus* por características morfológicas utilizando el método UPGMA.

2.3.2 Citogenética

La observación citológica mostró variación en el número de juegos cromosómicos de diploide $2n = 2X = 14$ a dodecaploide $2n = 12X = 84$, en las especies identificadas *R. niveus*, *R. glaucus*, *R. adenotrichos*, *R. aff. glaucus*, *R. aff. liebmannii*, *R. pringlei*, *R. eriocarpus*, *Rubus* variedad comercial, *R. sapidus*, *R. trilobus* y *R. parviflorus*. De acuerdo con lo descrito por Hart y Bleij (2003) el número de cromosomas en el núcleo de cada especie es específico y característico. Este número puede variar considerablemente entre diferentes especies y a lo largo de la evolución se han observado tanto aumentos como disminuciones en el número de cromosomas. Estos cambios son parte del proceso evolutivo y pueden estar relacionados con la especiación, es decir, la formación de nuevas especies (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2011).

El genotipo descrito como *Rubus niveus* fue identificado como hexaploide $2n = 6X = 42$ (Figura 14). En las plantas, la combinación de poliploidía, e hibridación ha sido responsable de la aparición de cientos de nuevas especies, e influye significativamente en su evolución y diversidad (Mariotti et al., 2009; Navajas-Pérez et al., 2006).

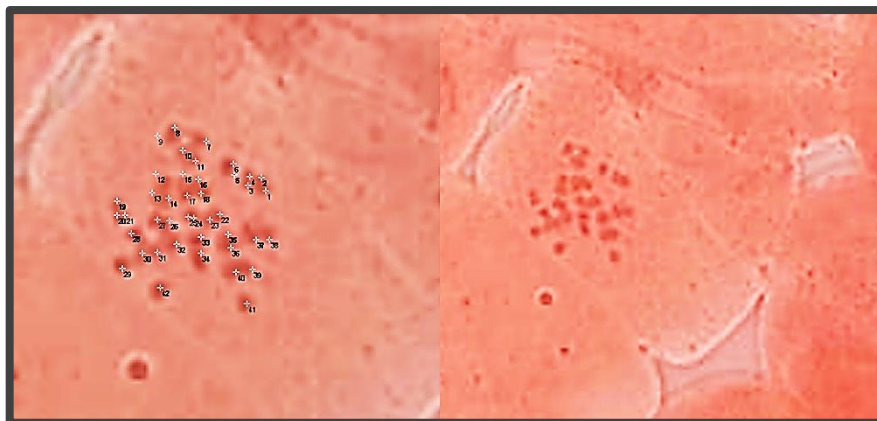


Figura 14. Conteo cromosómico de *Rubus niveus* $2n = 6X = 42$.

El genótipo identificado como *Rubus glaucus* (Figura 15 a) fue determinado como triploide $2n = 3X = 21$ y el *Rubus* aff. *glaucus* (Figura 15b) $2n = 5X = 35$ lo que es diferente a lo reportado por Castellanos et al. (2023); Delgado et al. (2010). Esto se puede deber en parte a la ocurrencia de hibridación y la apomixis, lo que conduce a cultivares morfológicamente similares (López et al., 2019).

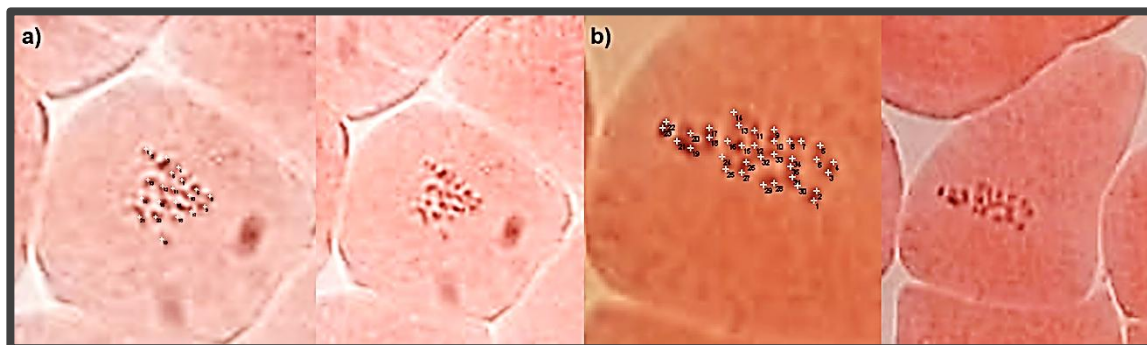


Figura 15. Conteo cromosómico de a) *Rubus glaucus* $2n = 3X = 21$ y b) *Rubus* aff. *glaucus* $2n = 5X = 35$.

En el caso del genotipo identificado como *Rubus adenotrichus* (Figura 16), fue observado como diploide $2n = 2X = 14$, lo cual coincidió con lo indicado por Rodríguez-Bautista et al. (2019) y Thompson (1995). Por lo que podemos asumir que *R. adenotrichus* tiene una reproducción mayormente sexual y vegetativa para no haber variación en el número de cromosomas (Monasterio-Huelin, 1995).

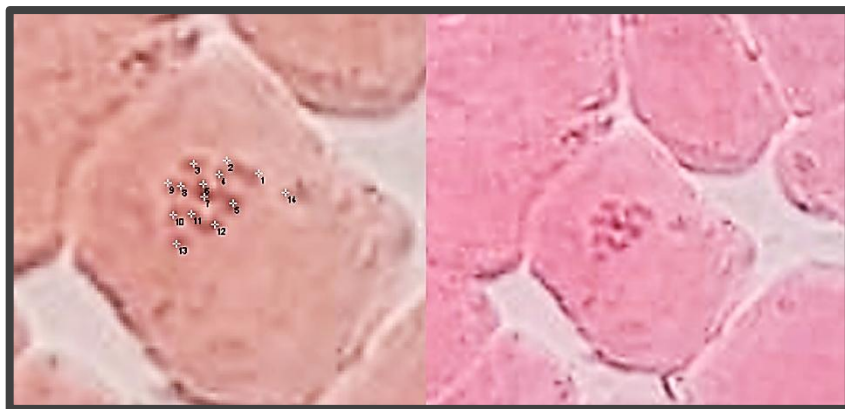


Figura 16. Conteo cromosómico de *Rubus adenotrichus* $2n = 2X = 14$.

Se sabe que las especies con apomixis gametofítica son poliploides como lo indicaron Carman (2007); Koltunow et al. (1995) y Nogler (1984).

En el caso de los genotipos *R. aff. liebmannii* (Figura 17) y *R. eriocarpus* (Figura 18) fueron identificados como tetraploides $2n = 4X = 28$.

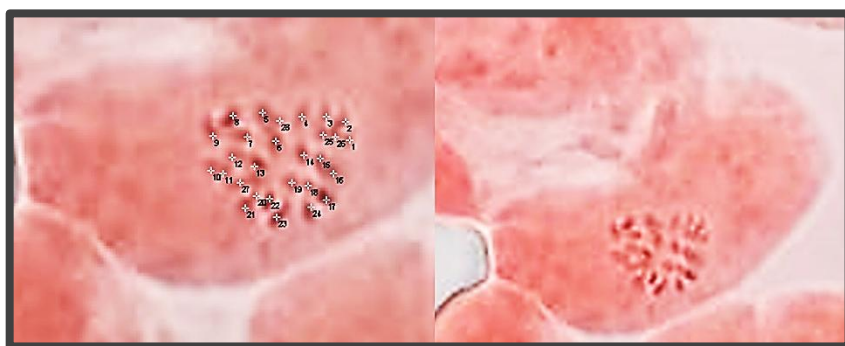


Figura 17. Conteo cromosómico de *Rubus liebmannii* $2n = 4X = 28$.



Figura 18. Conteo cromosómico de *Rubus eriocarpus* $2n = 4X = 28$.

Distinto a lo encontrado por Rodríguez-Bautista et al. (2019) el genotipo identificado como *R. pringlei* fue registrado como heptaploide $2n = 7X = 49$, (Figura 19). La poliploidía es reconocida como un mecanismo crucial para la adaptación y la especiación en plantas. Durante la evolución de los poliploides, se presentan con frecuencia barreras de fertilidad y eventos inusuales, como la formación de gametos no reducidos y la hibridación entre especies. Sin embargo, aún se comprende poco acerca de cómo estos factores, junto con otros, afectan las tasas generales de generación de nuevas especies poliploides (Ramsey & Schemske, 1998).



Figura 19. Conteo cromosómico de *Rubus pringlei* $2n = 7X = 49$

La variedad comercial Veracruz Vigas de *Rubus* fue descrita (Figura 20), como hexaploide $2n = 6X = 42$, Se ha comprobado que estos niveles de ploidía resultan de la hibridación entre distintas especies, lo que lleva a clasificarlas como alopoliploides (Chen et al., 2015; Mimura et al., 2014) y sobre todo en variedades comerciales donde la hibridación es muy frecuente.



Figura 20. Conteo cromosómico de la variedad comercial de *Rubus* $2n = 4X = 42$.

Contrario a lo encontrado por Rodríguez-Bautista et al. (2019) *R. sapidus* (Figura 21) presentó doce juegos de cromosomas (dodecaploide) $2n = 12X = 84$, demostrando la complejidad del género a nivel taxonómico y se comprueba lo mencionado por Graham & Woodhead (2009).

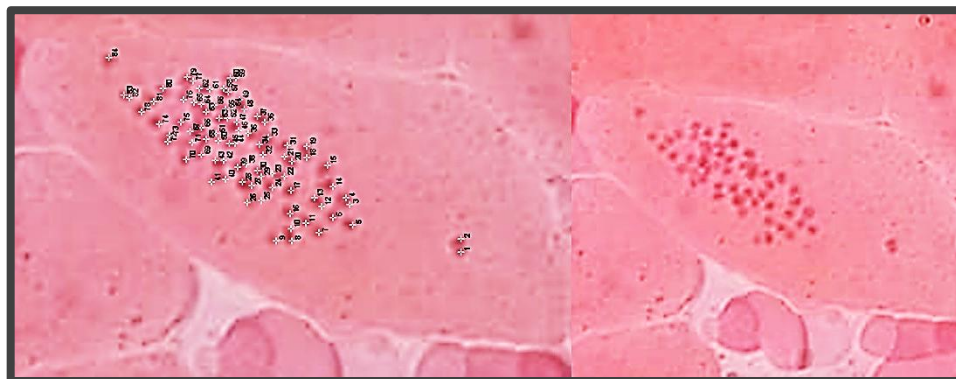


Figura 21. Conteo cromosómico de *Rubus sapidus* $2n = 12X = 84$.

Rubus trilobus fue identificada como triploide $2n = 3X = 21$ lo que es diferente a lo publicado por Iwatsubo y Naruhashi (1991) (Figura 22) y *Rubus parviflorus* identificada como tetraploide $2n = 4X = 28$ (Figura 23). Lo que puede deberse al mecanismo de reproducción facultativo en especies con nivel de ploidía superior a dos o pseudogamia (Monasterio-Huelin, 1995).



Figura 22. Conteo cromosómico de *Rubus trilobus* $2n = 3X = 21$.

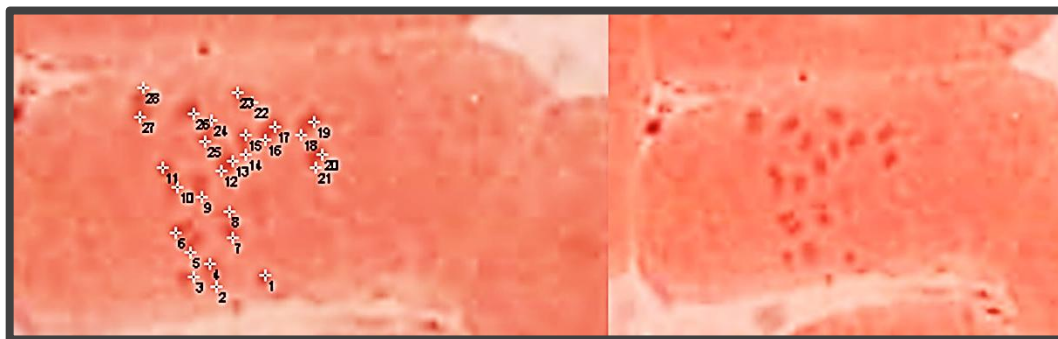


Figura 23. Conteo cromosómico de *Rubus parviflorus* $2n = 4X = 28$.

El tamaño de los cromosomas varió entre $0.032 \mu\text{m}$ siendo los más pequeños a $0.17 \mu\text{m}$ los más grandes, de *R. pringlei* y *R. aff. glaucus*, respectivamente (Cuadro 3). El análisis de correlación entre la longitud de los cromosomas y el número, por genotipos arrojó una $r=0.226$ ($P \leq 0.05$), por lo que existe poca relación y conforme a lo indicado por Caiza et al. (2018), que el tamaño de los cromosomas varía según la especie y el tipo de cromosomas, teniendo como referencias la especiación, evolución y las aberraciones cromosómicas en otros géneros dentro de la familia de las Rosaceae (Caiza et al., 2018).

Cuadro 3. Longitud promedio y número de los cromosomas de especies de *Rubus*.

Genotipo	Especie	Longitud promedio	Cromosomas
Niv	<i>R. niveus</i>	0.097	42
1-6	<i>R. glaucus</i>	0.055	21
2-3	<i>R. adenotrichus</i>	0.040	14
3-2	<i>R. aff. glaucus</i>	0.175	35
3-7	<i>R. aff. liebmannii</i>	0.103	28
4-6	<i>R. pringlei</i>	0.032	49
5-1	<i>R. eriocarpus</i>	0.058	28
5-6	<i>R. Veracruz Vigas</i>	0.060	42
6-2	<i>R. sapidus</i>	0.104	84
7-1	<i>R. trilobus</i>	0.073	21
7-2	<i>R. parviflorus</i>	0.080	21

2.4 CONCLUSIÓN

La identificación y clasificación de los once genotipos del género *Rubus* de diversas localidades, principalmente de Chiapas, mostró ocho genotipos específicos y dos con afinidad a especies del género, donde se describió detalladamente sus características vegetativas y estructurales que concordaron con referencias taxonómicas previas.

El análisis citogenético, determinó que los genotipos presentaron variaciones en sus niveles de ploidía, desde diploides hasta dodecaploides, destacó la diversidad cromosómica del género *Rubus* como resultado de procesos evolutivos y mecanismos de adaptación.

Este hallazgo reforzó la importancia de la poliploidía y la hibridación en la especiación, lo que influye en la diversidad y adaptación de plantas de *Rubus*. Los resultados obtenidos en ambas evaluaciones destacaron que las características morfológicas y el análisis citogenético pueden ser utilizados para la identificación *ex situ* de la diversidad de *Rubus* y para la evaluación de materiales promisorios en futuros estudios de conservación y mejoramiento del género *Rubus*.

2.5 LITERATURA CITADA

- Bentham, G. (1839). *Plantas Hartwegianas: Imprimis mexicanas adjectis nonnullis grahamianis enumerat novasque describit.* R Societate Linneana Londinensi. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/796624>
- Donnel Smith, J. (1893) Undescribed plants form Guatemala. XI. *Botanical Gazette*, 18(6), 197-211. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/29400375>
- Caiza, J., C., Vargas, D., Olmedo, C., Arboleda, M., Boada, L., Acurio, O., Arroyo, C., Debut, A, & Segovia-Salcedo, M. (2018). Morfometría y morfología de estomas y de polen como indicadores indirectos de poliploidía en especies del género *Polylepis* (Rosaceae) en Ecuador. *Ecología Austral*, 28, 175-187. http://hdl.handle.net/20.500.12110/ecologiaaustral_v028_n01bis_p175
- Cancino-Escalante, G., Sánchez-Montaña, L., Quevedo-García, E., & Díaz-Carvajal, C. (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. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc16-3.pcor>
- Castellanos, D., Escalante, G., Contreras, D., & Cardenas, D. (2023). Diversidad genética de *Rubus Glaucus* Benth en el municipio de Pamplona (Nororiente de Colombia). *BISTUA Revista de la Facultad de Ciencias Basicas*. 19, 8-14. <https://doi.org/10.24054/bistua.v19i2.1125>
- Chen, Q., Wang, H., Nan, L., Zhang, H., & Wang, X. (2015). Meiotic configuration and rDNA distribution patterns in six *Rubus* taxa, *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 75(2), 242-249 <https://doi.org/10.5958/0975-6906.2015.00037.1>

- Delgado, L., Lastra, M., & Marulanda Angel, M. (2010). Estandarización de la técnica citogenética squash para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica*, 3(46), 74–79.
- Efron, B. (1979). *Bootstrap methods: Another look at the jackknife*. *The Annals of Statistics*, 7(1), 1–26.
- Fassett, N. (1941). Mass Collections: *Rubus odoratus* and *R. parviflorus*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 28(299), 299–374.
<https://doi.org/10.2307/2394353>
- García-Mendoza, A., & Meave, J. (2011). *Diversidad florística de Oaxaca: de musgos a angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- George Don, F. L. S. (1831). *A general history of the dichlamydeous plants: comprising complete descriptions of the different orders. The whole arranged according to the natural system*. Gilbert and Rivington Printers.
<https://www.biodiversitylibrary.org/page/341223>
- Graham, J., & Woodhead, M. (2009). Raspberries and blackberries: The genomics of *Rubus*. In K. M. Folta & S. E. Gardiner (Eds.), *Genetics and genomics of Rosaceae* (pp. 507–524). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_24
- Hart, H., & Bleij, B. (2003) *Sedum*. En *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Crassulaceae*. (U. Eggli, Ed.). *Berlín: Springer*, 4, 235–300.
- Heslop-Harrison, J., & Schwarzacher, T. (2011). Organisation of the plant genome in chromosomes: organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal*, 66(1), 18–33.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04544.x>
- Hickman, J. (1993). *The Jepson manual: Higher plants of California*. University of California Press.
- Iwatsubo, Y., & Naruhashi, N. (1991). Karyomorphological and cytogenetical studies of *Rubus parvifolius*, *R. coreanus* and *R. x hiraseanus*

(Rosaceae). *Cytologia*, 56(1), 151–156.
<https://doi.org/10.1508/cytologia.56.151>

Landázuri, O. (2010). La ‘Mora’ *Rubus niveus*, algunos datos importantes sobre la especie en el contexto de la problemática de control y erradicación de la especie. *La Granja*, 12(2), 28-31.

Lawrence, A. (2012). *Rubus parviflorus*, in Jepson Flora Project (eds.) Jepson eFlora, https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=42108, accessed on October 14, 2024.

López, A., Barrera, C., & Marulanda, M. (2019). Evaluación de marcadores SSR y SNP en la selección de progenitores de *Rubus Glaucus Benth.* *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(1), 1-14.

Lu, L., & Boufford. (2003). *Rubus*. In: Wu ZY, Raven PH, Hong DY Flora of China. *Science Press, Beijing*, 9, 195–285

Lu, L., & Yu, T. (1985). *Rubus*. In: Yu TT Flora Reipublicae Popularis Sinicae. *Science Press, Beijing*, 37, 10–218.

Mariotti, B., Manzano, S., Kejnovský, E., Vyskot, B., & Jamilena, M. (2009). Acumulación de ADN satélite específico de y durante la evolución de los cromosomas sexuales de *Rumex Acetosa*. *Mol. Gineta. Genómica*, 281, 249 – 259.

Marulanda, M., & Marquez, M. (2001). Caracterización de la diversidad de *rubus glaucus benth.* con marcadores moleculares RAPD. *Actual. Biol.* 23, 57-63.

Meng, R., & Finn, C. (2002). Determining ploidy level and nuclear DNA content in *rubus* by cytometry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127 (5), 767-775.

Mimura, M., Mishima, M., Lascoux, M., & Yahara. T. (2014). “range shift and introgression of the rear and leading populations in two ecologically

distinct rubus species”, *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 209. doi: 10.1186/s12862-014-0209-9.

Monasterio-Huelin, E. (1995). Biología de reproducción en *Rubus* L. (Rosaceae). propagación vegetativa. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 52(2): 145-149.

Moreno, N. (1984). Glosario botánico ilustrado (Instituto nacional de investigación sobre recursos bóticos, Ed.). Compañía Editorial Continental, S. A. DE C. V.

Morillo, A., Morillo, J., Muñoz, H., Vásquez J., & Zamorano, A. (2005). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios rams de la colección de mora, *Rubus* spp., de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. *Acta Agron.* 54, 1-15.

Navajas-Pérez, R., Schwarzacher, T., de la Herrán, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M. & Garrido-Ramos, MA (2006). El origen y evolución de la variabilidad en un ADN satélite específico de *Rumex acetosa* y sus parientes. *Gen*, 368, 61 – 71.

New York Botanical Garden. (1905). North American flora, New York Botanical Garden. 22(5), 443. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/751086>

Niembro, A., Vázquez-Torres, M. & Sánchez-Sánchez, O. (2010). Árboles de Veracruz, 100 especies para la reforestación estratégica. *Gobierno del Estado de Veracruz-Universidad Veracruzana*. 255.

Nuttall, Thomas. (1818). the genera of north american plants, and a catalogue of the species, to the year 1817. Printed for the author by D. Heartt. 1, 308. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/722508>

Ramsey, J., & Schemske, D. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 467–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>

- Rodríguez-Bautista, G., Segura-Ledesma, S., Cruz-Izquierdo, S., Corona-Torres, T., López-Medina, J., Gutierrez-Espinoza, M. A., Cruz-Huerta, N., & Valenzuela-Núñez, L. M. (2018). Poliploidía en zarzamoras silvestres (*Rubus* spp L.). *Nova Scientia*, 10(21), 1–16. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1385>
- Rodriguez-Bautista, G., Segura Ledesma, S. D., Cruz-Izquierdo, S., López-Medina, J., Gutierrez-Espinosa, A., Cruz-Huerta, N., Carrillo-Salazar, J., & Valenzuela Núñez, L. M. (2019). distribución y variabilidad morfológica de especies de zarzamoras en México (*Rubus* spp L.). *Biotecnia*, 21(2), 97–105. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i2.935>
- Rubio, O., Pérez, E., Ávila, R., Leyva, T., Florencio, J., & García, P., A., (2019). Propiedades físicoquímicas de frutos silvestres de *Rubus* con potencial nutracéutico y alimenticio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(23), 291-301. Epub 20 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2028>
- Sánchez-Velázquez, O., Rivera-Atondo, M., Milán-Carrillo, J., Montes-Ávila, J., Mora-Rochín, S., & Cuevas-Rodríguez, E. (2024). Morphological and nutritional characterization of wild edible blackberries (*Rubus* spp.) from Sinaloa, Mexico. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 68(2), 248–263. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v68i2.1868>
- Segura, S., Zavala, D., Equihua, C., Andrés, J., & Yopez, E. (2009). Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(83), 297-305.
- Schiedeo, G., & Ehrenbergio, C. (1839). De plantis mexicanis. *Linnaea: Ein Journal für die Botanik*, 13, 260-267. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/109747>
- Smith, John. (1889). Enumeratio plantarum Guatemalensium imprimis a H. de Tuerckheim collectarum. H.N. Patterson. 2, 19 <https://www.biodiversitylibrary.org/page/707467>

- Sociedad de Ciencias Naturales de Bremen. (1866). Abhandlungen herausgegeben vom Naturwissenschaftlichen Verein zu Bremen. Im Selbstverlag des Naturwissenschaftlichen Vereins. 4, 158. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/33705871>
- Sociedad de Hist3ria Natural de Copenhagen. (1849). Videnskabelige meddelelser fra den Naturhistoriske forening i Kjøbenhavn. *Selskabets Bestyrelse*. 162. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/7723758>
- Sokal, R., & Michener, C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38, 1409-1438.
- Sokal, R., & Sneath, P.H.A. (1963). Principles of Numerical Taxonomy. WH Freeman.
- Standley, P. C., & Steyermark. J. A. (1946). Rosaceae. P.C. Standley, & J.A. Steyermark (Eds.), Flora of Guatemala - Part IV. *Fieldiana, Botany* 24(4): 432–484
- Standley, P.C., & Steyermark, J.A. (1976). Flora de Guatemala. <http://www.archive.org/>
- Thompson, M. M. (1995). Chromosome numbers of *Rubus* species at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience*, 30(7), 1447–1452. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.7.1447>
- WFO (2024): *Rubus niveus* Thunb. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000995169>. Accessed on: 11 Oct 2024.
- Xiong, X.-H., Zhou, X.-M., Li, M., Xu, B., Deng, H.-N., Yu, Q., & Gao, X.-F. (2019). Pollen morphology in *Rubus* (Rosaceae) and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 305(8), 705–716. <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01600-7>

Zamorano, A., Morillo, A.C., Morillo, Y., Vásquez, H., & Muñoz, J. (2007).
Caracterización morfológica de mora en los departamentos de Valle del
Cauca, Cauca y Nariño, de Colombia. Acta Agron. 56, 51-60.

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIEZ GENOTIPOS SILVESTRES DE *Rubus* spp. CON MARCADORES ISSR Y SSR

RESUMEN

El género *Rubus* spp., reconocido por su importancia económica y notable diversidad genética, enfrenta retos taxonómicos debido a fenómenos como la poliploidía, hibridación y apomixis, que dificultan su clasificación. Este estudio caracterizó molecularmente diez genotipos silvestres y una variedad comercial de *Rubus* spp. provenientes de Chiapas, Veracruz, Hidalgo y Texcoco, se utilizó marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) y SSR (Simple Sequence Repeats). Las muestras fueron propagadas y analizadas bajo condiciones controladas, permitiendo una evaluación exhaustiva de su diversidad genética. Con los marcadores ISSR se detectaron 204 bandas polimórficas, se alcanzó un 100% de polimorfismo. Los iniciadores UBC855 y CGA sobresalieron por su capacidad de discriminar genotipos, lo que evidenció una alta variabilidad genética dentro del grupo estudiado. Por su parte, los marcadores SSR generaron 596 alelos, siendo *Rubus* 16a y *Rubus* 98d los *loci* más informativos al producir numerosos alelos únicos. Los análisis de dendrogramas y coordenadas principales agruparon los genotipos en cuatro conglomerados, mostrando una fuerte correspondencia entre los resultados obtenidos con ISSR y SSR, aunque con algunas diferencias en la agrupación. La combinación de ISSR y SSR demostró ser una herramienta poderosa para superar las limitaciones de los estudios morfológicos y geográficos, revelando patrones genéticos complejos que incluyen posibles subpoblaciones en *Rubus glaucus*. Este enfoque integral no solo aporta conocimientos sobre la estructura genética de *Rubus* spp., sino que también establece una base sólida para estrategias de conservación y mejoramiento genético, fundamentales para preservar su variabilidad y potenciar su cultivo.

Palabras clave: Hibridación, plasticidad genética, ploídia, polimorfismo.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Diana Yaret Tierrablanca Plaza

Dirección: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

CHAPTER III- MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TEN WILD GENOTYPES OF *Rubus* spp. USING ISSR AND SSR MARKERS.

ABSTRACT

The genus *Rubus* spp., recognized for its economic importance and remarkable genetic diversity, faces taxonomic challenges due to phenomena such as polyploidy, hybridization, and apomixis, which complicate its classification. This study molecularly characterized ten wild genotypes and one commercial variety of *Rubus* spp. from Chiapas, Veracruz, Hidalgo, and Texcoco, using ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) and SSR (Simple Sequence Repeats) markers. The samples were propagated and analyzed under controlled conditions, allowing for a comprehensive evaluation of their genetic diversity. Using ISSR markers, 204 polymorphic bands were detected, reaching 100 % polymorphism. The primers UBC855 and CGA stood out for their ability to discriminate genotypes, evidencing high genetic variability within the studied group. Meanwhile, SSR markers generated 596 alleles, with *Rubus* 16a and *Rubus* 98d being the most informative loci by producing numerous unique alleles. Dendrogram analyses and principal coordinate analysis grouped the genotypes into four clusters, showing a strong correspondence between the results obtained with ISSR and SSR, although with some differences in clustering. The combination of ISSR and SSR proved to be a powerful tool to overcome the limitations of morphological and geographical studies, revealing complex genetic patterns that include possible subpopulations in *Rubus glaucus*. This integrated approach not only provides insights into the genetic structure of *Rubus* spp., but also establishes a solid foundation for conservation and genetic improvement strategies, which are fundamental for preserving their variability and enhancing their cultivation.

Keywords: Hybridization, genetic plasticity, ploidy, polymorphism.

Master of Science in Agriculture Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Diana Yaret Tierrablanca Plaza

Director: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

3.1 INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* spp. incluye plantas de importancia económica como las zarzamoras y frambuesas, caracterizadas por su gran diversidad genética y morfológica. Esta diversidad, combinada con su historia evolutiva marcada por la poliploidía, la hibridación y la apomixis, dificulta su clasificación taxonómica tradicional (Alice & Campbell, 1999; Meng & Finn, 2002) y ha impulsado el desarrollo y aplicación de herramientas moleculares como los marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) para el análisis genético de este género (Wang et al., 2018).

En este contexto, los marcadores moleculares han emergido como herramientas clave para el estudio de la diversidad genética y las relaciones filogenéticas en *Rubus* spp.

Los marcadores de tipo ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) han sido ampliamente utilizados debido a su capacidad para generar perfiles altamente polimórficos, ideales para estudios de variabilidad genética en especies silvestres y cultivadas (Amenduni et al., 2004; Debnath, 2007). Por ejemplo, Wu et al. (2014) emplearon ISSR para evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional de especies de *Rubus* en China, revelando altos niveles de diversidad genética tanto dentro como entre poblaciones. De manera similar, Guasmi et al. (2012) demostraron la eficacia de los ISSR para diferenciar genotipos en estudios de hibridación y mejoramiento.

Por otro lado, los marcadores SSR (Simple Sequence Repeats), también conocidos como microsatélites, se destacan por su naturaleza codominante, reproducibilidad y especificidad. Debnath (2008) y Graham et al. (2004) desarrollaron y aplicaron SSR para identificar cultivares de zarzamoras y frambuesas, mostrando su utilidad en la caracterización genética y el mejoramiento. Además, el uso combinado de SSR e ISSR ha permitido estudios más integrales, como el realizado por Mnejja et al. (2005), quienes analizaron la diversidad genética en variedades de *Rubus* y subrayaron la complementariedad de estos marcadores.

Los marcadores SSR, conocidos por su alta especificidad y naturaleza codominante, han sido ampliamente utilizados para evaluar la estructura genética y diversidad en *Rubus*. Por ejemplo, Yoon et al. (2020) desarrollaron y aplicaron microsatélites para identificar patrones de diversidad genética en cultivares de frambuesas, revelando diferencias significativas entre poblaciones. De manera complementaria, los ISSR han demostrado ser una herramienta efectiva para el análisis de variabilidad genética en especies silvestres, debido a su capacidad para detectar altos niveles de polimorfismo sin requerir información genómica previa (Cai et al., 2019).

Estudios recientes han combinado ambos tipos de marcadores para obtener una visión más completa de la diversidad genética. Al respecto, Samriti et al. (2017) utilizaron SSR e ISSR para analizar poblaciones silvestres de *Rubus glaucus*, confirmando la eficacia de estas herramientas para diferenciar genotipos y proponer estrategias de conservación. Además, investigaciones como la de Ahmed et al. (2021) han destacado la aplicabilidad de estos marcadores para mejorar cultivares mediante el análisis de relaciones filogenéticas y la identificación de genes asociados a características de interés.

En conjunto, los marcadores moleculares SSR e ISSR han revolucionado el estudio de *Rubus* spp., y proporciona información crucial para su clasificación, conservación y mejoramiento genético. Por lo que los objetivos principales de este estudio fueron identificar las diferencias moleculares y evaluar la diversidad genética de once accesiones de *Rubus* spp.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

Se estudiaron un total de 10 especies silvestres y una variedad comercial de *Rubus* L. (Cuadro 4) colectadas en Chiapas, Veracruz, Hidalgo y Texcoco; estos genotipos fueron previamente identificados y caracterizados en nivel de ploidía. Se establecieron bajo condiciones de invernadero en los invernaderos del campo

agrícola experimental del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cuadro 4. Genotipos, lugar de ubicación y número de cromosomas de *Rubus* spp. estudiados.

Código	Especie	Procedencia	Numero cromosómico
Rn	<i>Rubus niveus</i>	Chiapas	42
Rg	<i>Rubus glaucus</i>	Chiapas	21
Ra	<i>Rubus adenotrichus</i>	Chiapas	14
ARg	<i>Rubus</i> aff. <i>glaucus</i>	Texcoco	35
ARI	<i>Rubus</i> aff. <i>liebmannii</i>	Chiapas	28
Rpri	<i>Rubus pringlei</i>	Chiapas	49
Re	<i>Rubus eriocarpus</i>	Chiapas	28
Rvc	<i>Rubus</i> variedad comercial Vigas	Veracruz	42
Rs	<i>Rubus sapidus</i>	Hidalgo	84
Rt	<i>Rubus trilobus</i>	Veracruz	21
Rpar	<i>Rubus parviflorus</i>	Chiapas	21

Dado que las plantas eran adultas cuando estas fueron colectadas, se utilizó la técnica de propagación por estaca, para la obtención del material requerido en buenas condiciones. Se propagaron las plantas y se mantuvieron en bolsas de plástico; las bolsas fueron de volumen de 8 L y el sustrato utilizado fue una mezcla volumen 1:1:1:4 de “peat moss”, agrolita, tezontle y tierra, se aplicó RADIX 1000, regulador de crecimiento tipo 1, para generar el crecimiento radical. La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y la amplificación mediante PCR y la electroforesis en el Laboratorio de Marcadores

Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.2 Extracción de ADN

En la extracción del ADN genómico, se colectó hojas jóvenes de 2 cm² por cada planta y se procedió a la extracción utilizando el método reportado por Doyle y Doyle (1987). Se presentaron complicaciones con la pureza del ADN por el alto contenido de polifenoles, por lo que fue necesario fenolizar una vez más el ADN extraído. Se aforó a 500 µL con TE cada una de las muestras de ADN y se agitó suavemente, posteriormente se adicionaron 500 µL de fenol y se agitó por inversión, se centrifugó a 21000 xg por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, después se adicionó 500 µL de cloroformo y se agitó por inversión. Luego se centrifugó a 21000 xg por 5 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 600 µL de Isopropanol y se dejó a 4 °C por media hora. Pasada la media hora se centrifugó a 21000 xg por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ADN. La pastilla de ADN fue resuspendida en TE al 1X y se almacenó a -4 °C hasta el momento de su uso.

3.2.3 Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la ADN polimerasa y se utilizó las siguientes condiciones: La cuantificación del ADN se realizó en Nanodrop 8000 de Thermo Scientific, para estandarizarlo a la concentración de 30 ng µL⁻¹.

La mezcla de PCR para los ISSR y SSR tuvo un volumen total de 26 µL; 2 µL de ADN (30 ng µL⁻¹), 15 µL de agua, 2 µL de dNTPs (5 ng µL⁻¹), 2.5 µL de amortiguador, 1.5 µL MgCl₂, 2 µL del oligonucleótido a 5 ng µL⁻¹ y 0.2 µL de Taq ADN polimerasa.

El termociclador marca Applied Biosystems™ Veriti™ se programó para los locus ISSR (Cuadro 5) y SSR (Cuadro 6) de acuerdo a la temperatura T_M (°C) específica para cada locus.

Cuadro 5. Secuencias de T_M de los marcadores ISSR utilizados.

n°	ISSR	SECUENCIA (5'-3')	T_M (°C)
1	AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGA	43
2	GT	VHVGTGTGTGTGTGTGTG	48
3	CGA	DHBCGACGACGACGACGA	48
4	CCA	DDBCCACCACCACCACCA	48
5	CA	DBDCACACACACACACAA	48
6	ACA	BCBACAACAACAACAACA	45
7	UBC 807	GAGAGAGAGAGAGAGAT	45
8	UBC 819	GTGTGTGTGTGTGTGTGTA	45
9	UBC831	ATATATATATATATATYA	42
10	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	43
11	UBC855	ACACACACACACACACYT	43
12	UBC856	ACACACACACACACACYA	43
13	ISSR7961	GAGAGAGAGAGAGAGAC	42
14	ISSR2	CACACACACACACACAAAGCT	42
15	ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	42
16	ISSR4	AGAGAGAGAGAGAGAGCTC	42
17	ISSR5	ACACACACACACACACTA	42
18	ISSR6	ACACACACACACACACTG	42

Las designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); R (A ó G); D (G ó A ó T); Y (C ó T); V (G ó A ó C).

Cuadro 6. Secuencias de T_M de los marcadores SSR utilizados.

n°	SSR	FORWARD (5'-3') REVERSE (5'-3')	T_M (°C)	Referencia
1	Rubus 16a	TGTTGTACGTGTTGGGCTTT GGGTGTTTGCCAGTTTCAGT	59	1
2	Rubus 76b	CTCACCCGAAATGTTCAACC GGCTAGGCCGAATGACTACA	59	1
3	Rubus 98d	GGCTTCTCAATTTGCTGTGTC TGATTTGAAATCGTGCGGTTA	59	1
5	Rubus 105b	GAAAATGCAAGGCGAATTGT TCCATCACCAACACCACCTA	59	1
9	Rubus 116a2	CCAACCCAAAAACCTTCAAC GTTGTGGCATGGCCTTTTAT	59	1
10	Rubus 259f2	TGGCACAAGAAGCCTGTAAC TCCCATATCCCTCAGCATTC	59	1
11	Rubus 263f	ATTCCGCCCTGCATAAATC GGAAATTGGAAACCATTGGA	59	1

6	Rubus 275a	CACAACCAGTCCCGAGAAAT CATTTTCATCCAAATGCAACC	59	1
4	RhM021	CAGTCCCTTATAGGATCCAACG GAACTCCACCATCTCCTCGTAG	50	2
7	RhM0113	AAAGACAAGGCGTCCACAAC GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	58	2
8	RiM0153	CGACACCGATCAGAGCTAATTC ATAGTTGCATTGGCAGGCTTAT	58	2
12	Rg D73	AACCATCGGTGTCGACCTC GGCTCTTGACCGGTAACCTAG	59	1
15	262	TGCATGAAGGCGATATAAAGG TCCGCAAGGTTGTATCCTA	59	3
13	280	TTCGGAATTTCGGATCAAAC CGACCAAAAAGGAATCAGC	59	3
14	277	GCCCCATCCTGTACAAAGAAA TTGCAACAAAGGTACGTAATGG	59	3

1:(Marulanda et al., 2012., 2012a) 2: (Garrido et al., 2020) 3: (Graham et al., 2002)

3.2.4 Visualización de los productos amplificados en el PCR

Los productos amplificados para ISSR se corrieron en camaras de electroforesis horizontales, en geles de agarosa a una concentración del 2 % con amortiguador TAE 0.5X. Se cargó 8 µL del producto amplificado y 4 µL de amortiguador de carga carga LB al 1X y se corrió a un voltaje de 110 voltios. Para los marcadores SSR fue necesario utilizar camaras de electroforesis vertical y geles de acrilamida al 8 %, con amortiguador TBE 1X a 80 voltios. Se cargó 8 µL de producto amplificado con 4 µL de buffer azul bromofenol, los geles se sumergieron en bromuro de etidio a 10 µL/mL y se visualizaron en el transilumador con ayuda del software VisionWorks®.

3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los marcadores ISSR se generó la matriz básica de datos de frecuencias de cada fragmento, donde fue considerado un locus independiente en dominancia completa con dos alelos, siendo la presencia el fenotipo dominante. La base de datos fue procesada con ayuda de los programas NTSYSpc 2.2, FreeTree.EXE y TreeView X para obtener, a partir de las frecuencias alélicas, el índice de información de Shannon; además, se obtuvo un dendrograma aplicando el coeficiente de Nei-Li (1979) y método de aglomeración UPGMA, con remuestreo

Bootstrap usando el método Jackknife con 1000 repeticiones (Efron, 1979); adicionalmente, usando la matriz de similitud del coeficiente de Nei y Li (1979) se generó un análisis de coordenadas principales (Gower, 1966) y se elaboró una representación tridimensional.

En el análisis de los marcadores SSR se utilizaron los programas VisionWorks®; para el análisis de polimorfismo por marcador, construcción de matrices de peso molecular y se hizo agrupación promedio, basado en el índice de similitud Dice (Nei & Li, 1979) individual para cada marcador. Además, se usaron los programas NTSYSpc 2.2, FreeTree.EXE y TreeView X; para obtener, a partir de las frecuencias alélicas, el índice de información de Shannon. También se generó un dendrograma aplicando el método de Phi (Sokal & Sneath, 1963), índice de similitud de Dice, con 1000 repeticiones con remuestreo por repetición y adicionalmente se generó la gráfica de coordenadas principales.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Iniciadores ISSR

Durante la evaluación molecular realizada con los iniciadores descritos en el Cuadro 7, se observaron alelos polimórficos entre las diversas especies de *Rubus*, lo que resaltó la notable diversidad genética presente en este grupo. Se registraron un total de 204 bandas polimórficas, lo que demostró la capacidad de los iniciadores utilizados para detectar variabilidad genética en las especies estudiadas. En cuanto al número de alelos únicos detectados por cada iniciador, este varió entre 1 y 7. Cabe destacar que el iniciador (AG) fue el único que no presentó bandas únicas, lo cual es un aspecto a considerar en los análisis de polimorfismo.

El porcentaje de polimorfismo obtenido fue del 100%, lo que indicó que los marcadores empleados son altamente informativos y adecuados para estudios de diversidad genética en *Rubus*. Este hallazgo es consistente con lo encontrado por Goulão y Oliveira, (2001) y Khachtib et al. (2023, 2024) en estudios realizados

en especies de la familia *Rosaceae*, lo que refuerzó la efectividad de estos marcadores en la caracterización genética de diversas especies dentro de este grupo botánico.

Además, es importante mencionar que estos marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados en estudios de otras especies frutales, donde se han obteniendo igualmente buenos resultados. Por ejemplo, Dotor-Robay et al. (2016) destacaron que el uso de estos marcadores ha sido eficaz en la evaluación de la diversidad genética de otras especies, lo que respalda la validez de los hallazgos obtenidos en el presente estudio. De acuerdo con sus afirmaciones, el número de bandas polimórficas encontrado en este análisis se considera adecuado para estimar los parámetros genéticos de las especies de *Rubus* investigadas.

Cuadro 7. Índice de Shannon, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectados en especies de *Rubus*, usando iniciadores ISSR.

Iniciador	Índice de Shannon	Bandas polimórficas	Bandas	Polimorfismo (%)	Bandas únicas
UBC855	0.503	10	10	100	3
UBC 856	0.494	9	9	100	2
UBC853	0.540	12	12	100	5
UBC831	0.439	11	11	100	4
UBC819	0.534	11	11	100	6
UBC807	0.561	9	9	100	1
GT	0.388	13	13	100	3
CGA	0.564	13	13	100	7
CCA	0.476	12	12	100	3
CA	0.635	14	14	100	2
ACA	0.483	12	13	92.31	4
AG	0.483	7	7	100	0
7961	0.552	9	9	100	1

ISSR2	0.478	14	14	100	5
ISSR3	0.561	12	12	100	3
ISSR4	0.543	12	12	100	3
ISSR5	0.610	11	11	100	1
ISSR6	0.560	13	13	100	2

Las agrupaciones mostradas en el dendrograma (Figura 24) evidenciaron una organización interesante y reveladora sobre la relación genética existente entre los diferentes genotipos de *Rubus*. En el grupo uno, la mayoría de los genotipos provienen del estado de Chiapas, aunque dentro de este grupo también se encuentra el genotipo de Texcoco, identificado como *Rubus glaucus*. Un hallazgo inesperado dentro de este grupo es que el genotipo identificado como *Rubus glaucus*, que también pertenece a esta misma especie, se encuentra más alejado genéticamente de *R. aff. glaucus*. Este fenómeno sugiere que, si bien ambas identificaciones corresponden a la misma especie, existe una considerable variabilidad genética dentro de la especie *Rubus glaucus*, lo que puede ser indicativo de la presencia de subpoblaciones o variedades con características genéticas distintivas.

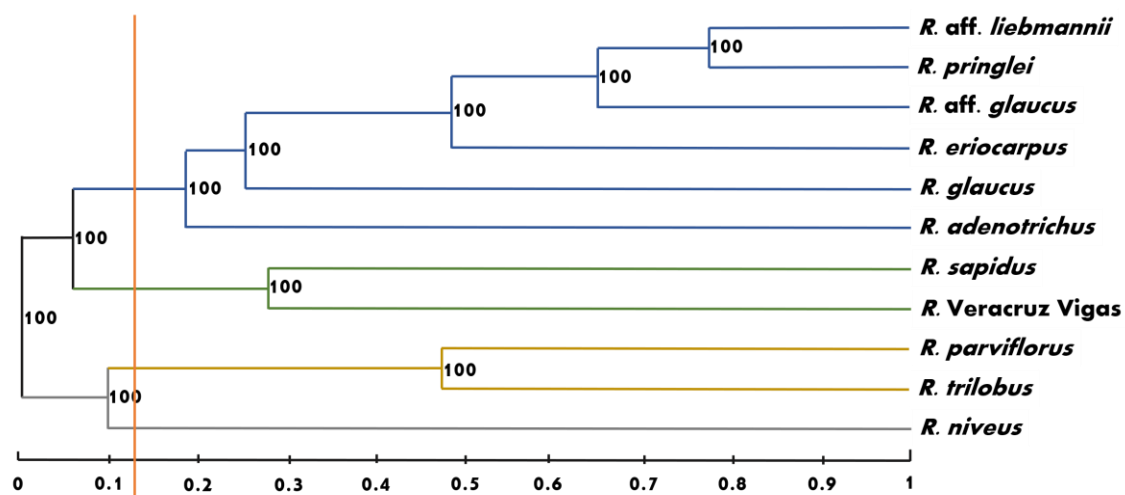


Figura 24. Dendrograma de relaciones genéticas entre especies de *Rubus*, obtenido por el método de Nei-Lee (1979).

El grupo dos estuvo compuesto por los genotipos de Veracruz e Hidalgo, *Rubus sapidus* y la variedad comercial *Rubus* Veracruz Vigas, respectivamente. Estos genotipos mostraron, a nivel molecular, una relación más estrecha de lo que sus características morfológicas sugerirían, ya que, aunque presentan diferencias morfológicas notables y provienen de diferentes zonas geográficas, molecularmente no son tan distintos. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Sedighi y Rahimmalek (2015), quienes señalaron la importancia de considerar tanto las características moleculares como morfológicas para el análisis taxonómico y la relación genética entre especies.

Por último, en el grupo tres se encuentran *Rubus trilobus* y *Rubus parviflorus*, los cuales provienen de Chiapas y Veracruz, respectivamente. Aunque estas especies no presentan grandes diferencias morfológicas, sus relaciones genéticas se reflejan en el análisis molecular, lo que sugiere que las características fenotípicas no siempre coinciden con la variabilidad genética de las especies. Finalmente, en el grupo cuatro, se observa únicamente *Rubus niveus*, lo que sugiere que esta especie forma un grupo genéticamente más aislado en comparación con las otras.

Este patrón de agrupación refleja, en general, el flujo genético entre las especies del género *Rubus*, lo que podría ser explicado, en parte, por los mecanismos de reproducción, como la hibridación o la apomixis, que son comunes en este género. Esta dinámica de intercambio genético entre especies de *Rubus* se puede atribuir a mecanismos reproductivos complejos, como los descritos por Dotor Robayo et al. (2016), quienes sugieren que el flujo de genes entre especies de este género puede ser un factor importante en la diversidad genética observada.

Es fundamental, al observar los grupos formados a partir de la evaluación molecular mediante el uso de marcadores ISSR, tener en cuenta el nivel de ploidía, ya que este es un factor decisivo relacionado con el tipo de reproducción que presenta el género *Rubus* y con los procesos de hibridación entre distintas

especies. Esta hibridación, a menudo entre especies genéticamente distantes, es la principal causa de la formación de aloploidos dentro del género (Mimura et al., 2014; Chen et al., 2015). En este contexto, no se observó una relación directa entre los grupos moleculares formados y el número de cromosomas, a excepción del grupo tres, en el que *Rubus trilobus* y *Rubus parviflorus* comparten el mismo número de cromosomas, mientras que *Rubus niveus* presenta el doble de cromosomas en comparación con *R. trilobus* y *R. parviflorus*. Esta diferencia en el número de cromosomas en *Rubus niveus* puede ser indicativa de su mayor complejidad genómica o de la presencia de mecanismos reproductivos como la poliploidía, que contribuyen a la variabilidad genética observada.

De manera similar, en el grupo dos, se observó una diferencia en el número de cromosomas entre los genotipos *Rubus Veracruz Vigas* y *Rubus sapidus*. *R. Veracruz Vigas* tiene 42 cromosomas, mientras que *R. sapidus* presentó 84 cromosomas, lo que sugiere que la variabilidad en el número de cromosomas puede estar relacionada con las características morfológicas diferenciadas de ambos genotipos. No obstante, a pesar de esta diferencia cromosómica, los dos genotipos muestran similitudes a nivel molecular, lo que les permite agruparse juntos en el análisis molecular, tal como se reflejó en la agrupación obtenida. Esto resaltó la complejidad de la relación entre la genética molecular y las características morfológicas, que en este caso parecen estar influenciadas por el número y tipo de cromosomas presentes.

Para complementar este análisis, se realizó un gráfico tridimensional basado en el análisis de coordenadas principales (Figura 25), con el fin de visualizar la asociación entre los diferentes genotipos de *Rubus* de manera más detallada. Los resultados obtenidos en esta representación tridimensional coincidieron con los encontrados en el análisis de conglomerados, mostrando claramente los cuatro grupos definidos en el espacio tridimensional. Este enfoque complementario permite una visualización más precisa de las relaciones entre los genotipos, facilitando la interpretación de los patrones de diversidad genética observados en el estudio.

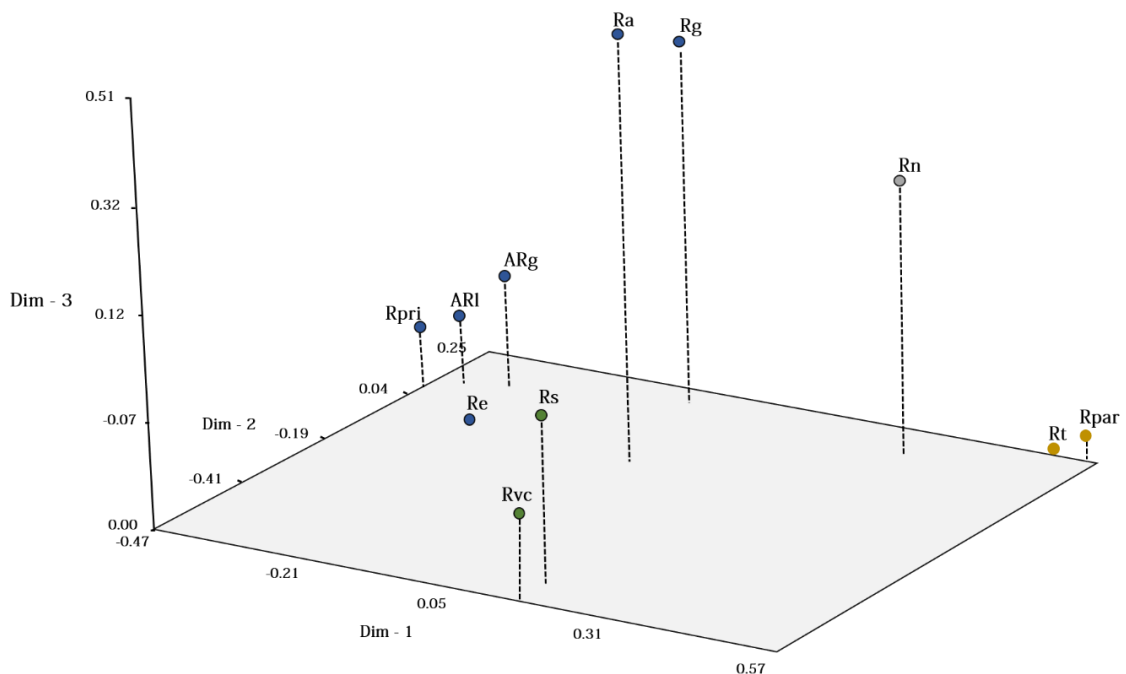


Figura 25. Gráfica tridimensional de coordenadas principales para ISSR que muestra los grupos formados entre las especies de *Rubus*. Grupo uno: *R. pringlei* (Rpri), *R. aff. Liebmannii* (ARI), *R. aff. glaucus* (ARg), *R. eriocarpus* (Re), *R. adenotrichus* (Ra) y *R. glaucus* (Rg). Grupo dos: *R. sapidus* (Rs) y *R. Veracruz Vigas* (Rcv). Grupo tres: *R. niveus*. Grupo cuatro: *R. trilobus* (Rt) y *R. parviflorus* (Rp).

3.3.2 Iniciadores SSR

Los resultados obtenidos de la evaluación de los genotipos mediante el uso de los marcadores SSR (Cuadro 8) indicaron que estos son altamente polimórficos, ya que se registró un total de 596 alelos. Entre estos alelos, se observaron alelos únicos que variaron en número, desde 7 para el marcador *Rubus* 263, hasta 45 para los marcadores *Rubus* 16a y *Rubus* 98d. Es importante resaltar que, en cuanto al porcentaje polimórfico, se alcanzó un 100 %, lo cual está en total concordancia con lo reportado por Marulanda y López (2012). Estos autores destacaron que los alelos exclusivos son fundamentales para la diferenciación de especies, especialmente en aquellas cuyas características morfológicas son muy similares entre sí. Esta observación es crucial, ya que la identificación genética precisa permite superar las limitaciones de las diferencias morfológicas y facilita

el estudio de especies que, de otro modo, podrían ser difíciles de distinguir solo mediante criterios morfológicos.

Cuadro 8. Índice de Shannon, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectados en especies de *Rubus*, usando iniciadores SSR.

Locus	Índice de Shannon	Bandas polimórficas	Bandas	Polimorfismo %	Bandas únicas
Rubus 16a	0.32	48	48	100	45
Rubus 76b	0.32	43	43	100	38
Rubus 98d	0.35	61	61	100	45
Rubus 105b	0.40	15	15	100	8
Rubus 116a ²	0.35	46	46	100	35
Rubus 259f	0.32	34	34	100	31
Rubus 263	0.42	14	14	100	7
Rubus 275a	0.35	52	52	100	40
RhM021	0.36	56	56	100	39
RhM0113	0.32	31	31	100	28
RiM0153	0.34	25	25	100	20
RgD73	0.33	38	38	100	33
262	0.34	30	30	100	25
280	0.37	58	58	100	41
277	0.34	45	45	100	38

Sin embargo, es necesario señalar una diferencia importante en este estudio con respecto a lo publicado por Alarcón et al. (2021). En su investigación, los loci SSR amplificados coincidieron con los pares de bases reportados en las referencias, mientras que, en este estudio, los alelos amplificados no correspondieron exactamente a los mismos pares de bases de las secuencias de referencia utilizadas. Esta discrepancia puede deberse a diversas razones, como la variabilidad genética presente en los genotipos evaluados, las condiciones experimentales o incluso las diferencias específicas de los loci SSR empleados. No obstante, estos hallazgos reforzaron la idea de que los marcadores SSR son herramientas altamente efectivas y confiables para la evaluación de la diversidad genética, permitiendo un análisis detallado y preciso de las relaciones genéticas dentro de *Rubus*.

Debido al alto nivel de polimorfismo obtenido con cada uno de los marcadores utilizados, se logró generar una agrupación promedio basada en el índice de similitud Dice (Figura 26). En esta agrupación, se observó que para los loci Rubus 105b, Rubus 259f, Rubus 263, Rubus 275a, RhM021, 280, y 277 se formaron tres grupos bien definidos. Por otro lado, para los loci que generaron cuatro grupos, se encontraron Rubus 16a, Rubus 76b, Rubus 98d, Rubus 116a², RhM0113, RiM0153, RgD73 y 262. Esta agrupación molecular obtenida es diferente de Alarcón et al. (2021), quienes al analizar diversos genotipos de *Rubus niveus* encontraron una baja presencia de alelos únicos y, en algunos casos, los genotipos solo presentaron un alelo amplificado. Esta discrepancia podría deberse a que los marcadores utilizados en el presente estudio fueron diseñados para diferentes especies dentro del género *Rubus*, lo que sugiere que estos marcadores presentan transferibilidad al amplificar correctamente los alelos en las especies aquí estudiadas. A esto se suma que, en otros estudios donde se han utilizado estos mismos marcadores, solo se ha analizado una única especie o cultivar de *Rubus* spp. (Garrido et al., 2020; Graham et al., 2002; Marulanda et al., 2012, 2012a).

Es importante resaltar que algunos loci mostraron grupos formados por un solo individuo. Este es el caso de Rubus 259f, que presentó a *Rubus sapidus* (Rs) y *Rubus glaucus* (ARg) como únicos representantes dentro del mismo grupo; Rubus 263 con *Rubus niveus* (Rn); 280 con *Rubus parviflorus* (Rpar); y 277 con *Rubus parviflorus* (Rpar) y *Rubus ellipticus* (Re). Estos resultados destacaron la variabilidad genética dentro de cada uno de los grupos y mostraron que, aunque algunos loci producen agrupaciones singulares, esto refleja la diversidad genética inherente a las especies estudiadas.

Además, se observó cómo se agrupan molecularmente las especies, lo que podría no parecer relevante a primera vista, pero cobra mayor importancia al comparar las características morfológicas de las especies dentro de cada grupo. Por ejemplo, el locus Rubus 105b agrupa a *Rubus Veracruz Vigas* (Rvc) y *Rubus glaucus* (Rg), mientras que en el locus Rubus 275a, *Rubus parviflorus* (Rpar) se

agrupa con *Rubus adenotrichus* (Ra). Este tipo de agrupación molecular sugirió que, aunque las especies se presentaron como morfológicamente diferentes, compartieron similitudes genéticas en algunos loci específicos.

En el caso del locus RhM021, se forma un grupo dos que agrupa a *Rubus niveus* (Rn), *Rubus* aff. *liebmannii* (ARl), *Rubus glaucus* (Rg) y *Rubus* aff. *glaucus* (ARg), especies que presentan características más similares entre ellas (Figura 28). Asimismo, para los loci Rubus 16a, Rubus 76b, Rubus 98d, RhM0113, y RiM0153, se forma un solo grupo que incluye a *Rubus parviflorus* (Rpar), aunque en dos ocasiones se encuentra agrupado con *Rubus trilobus* (Rt), con quien comparte características morfológicas muy similares (Figura 27, A y B). Por último, en los loci Rubus 116a2 y RgD73, se observó que estos también pertenecen al grupo 4, donde las especies presentadas se agrupan debido a su similitud molecular.

Estos resultados reforzaron la idea de que dentro del género *Rubus*, la diferenciación entre especies es compleja y se ve influenciada por diversos factores, como la morfología y la genética. Como lo han señalado Alice y Campbell (1999); Meng y Finn (2002), el análisis molecular ha demostrado ser una herramienta útil para superar las dificultades que existen a la hora de diferenciar una especie de otra dentro de este género, en el que la variabilidad genética y las características morfológicas pueden resultar no determinantes.

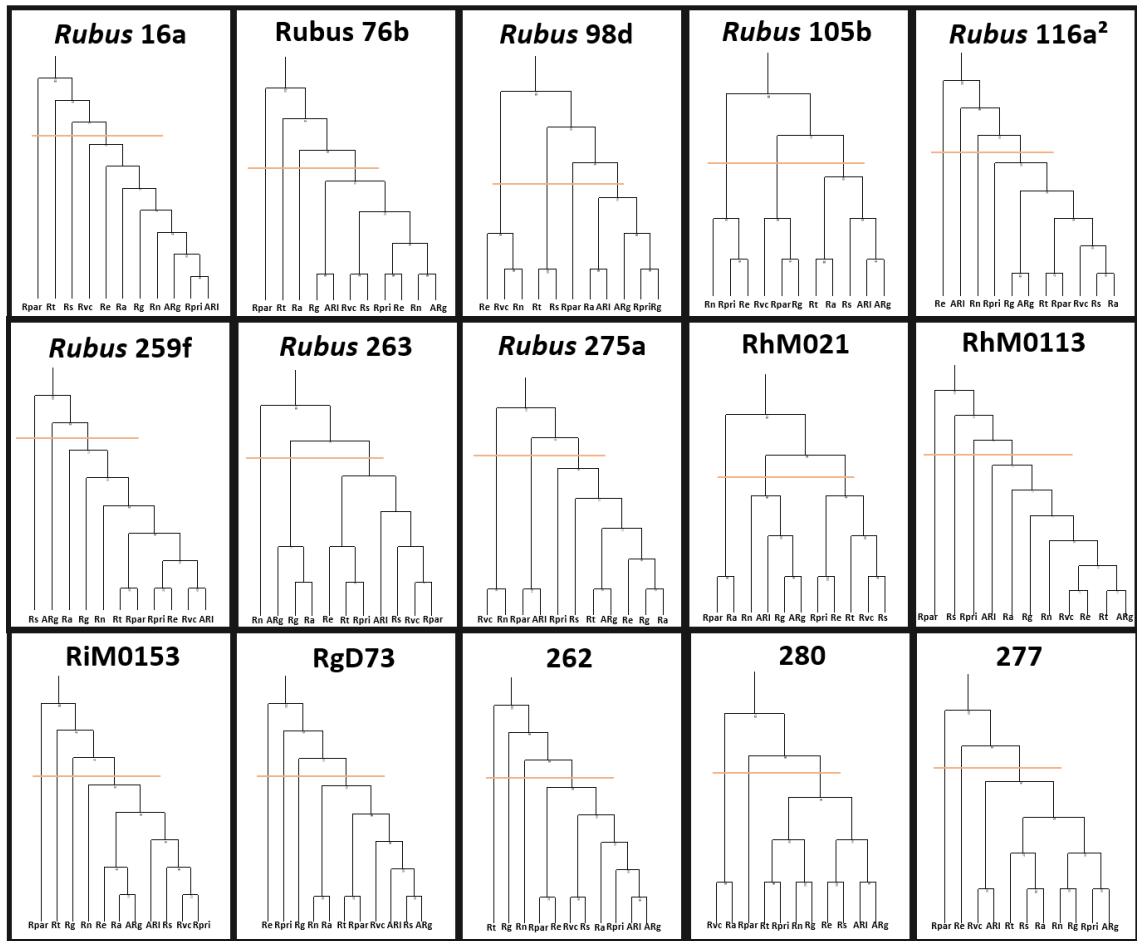


Figura 26. Agrupación promedio, basado en el índice de similitud Dice por SSR, *R. pringlei* (Rpri), *R. aff. Liebmannii* (ARI), *R. aff. glaucus* (ARg), *R. eriocarpus* (Re), *R. adenotrichus* (Ra), *R. glaucus* (Rg), *R. sapidus* (Rs), *R. Veracruz Vigas* (Rcv), *R. nieveus*, *R. trilobus* (Rt) y *R. parviflorus* (Rp).

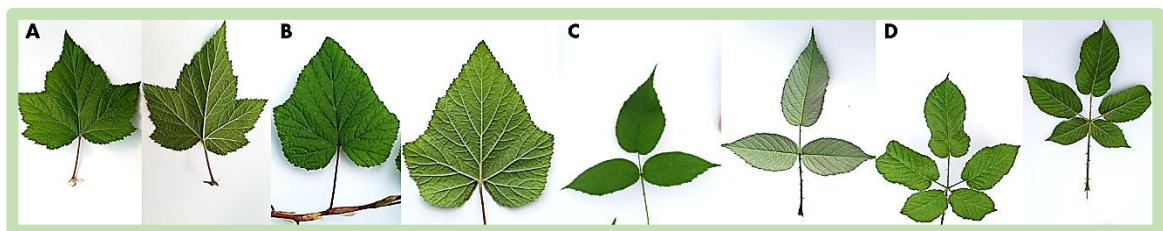


Figura 27. Comparación de morfología de hoja de A: *Rubus parviflorus*, B: *Rubus trilobus*, C: *Rubus glaucus*, D: *Rubus adenotrichus*

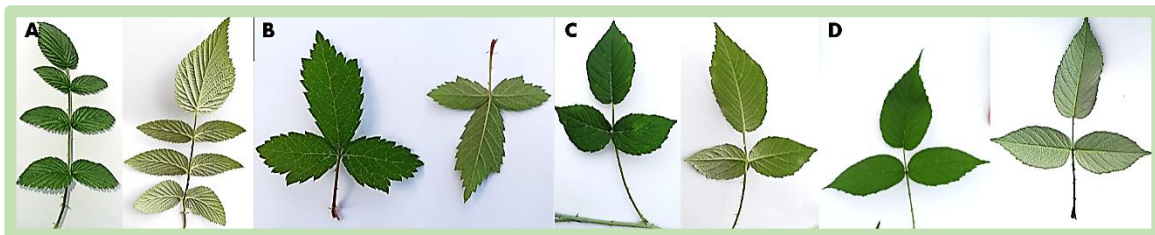


Figura 28. Comparación de morfología de hoja de A: *Rubus niveus*, B: afín *Rubus liebmannii* C: afín *Rubus glaucus* y D: *Rubus glaucus*.

El dendrograma general obtenido a partir de la evaluación de los datos de los *loci* SSR (Figura 29) mostraron resultados similares a los obtenidos con los marcadores ISSR, ya que ambos análisis revelan la formación de cuatro grupos. En este caso, el cuarto grupo estuvo compuesto por *Rubus niveus* (Rn), mientras que el tercer grupo incluye *Rubus trilobus* (Rt) y *Rubus parviflorus* (Rpar), grupos que se mantienen consistentes entre los dos tipos de marcadores. Sin embargo, el segundo grupo presentó una reconfiguración, pasando a estar formado por *Rubus adenotrichus* (Ra), *Rubus Veracruz Vigas* (Rvc) y *Rubus sapidus* (Rs), lo que sugirió que existen variaciones en la agrupación dependiendo de los *loci* analizados. Este agrupamiento no mostró una relación evidente con el número de cromosomas o el nivel de ploidía de los genotipos, lo cual implicó- que la variabilidad genética observada no está estrictamente asociada con la ploidía de cada especie.

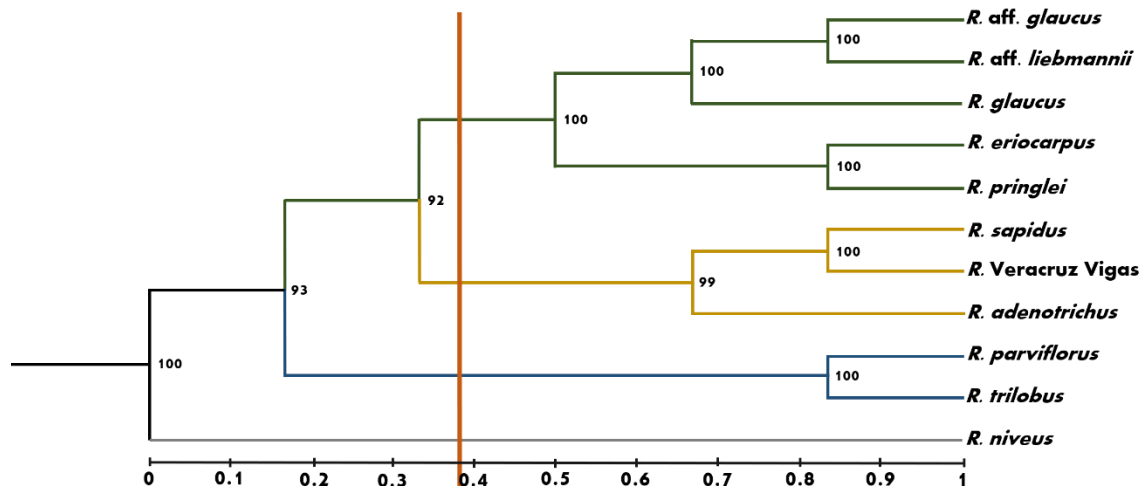


Figura 29. Dendrograma para SSR por el índice de similitud de Dice que muestra las relaciones genéticas entre especies de *Rubus*.

En cuanto al origen geográfico de los genotipos, se observó que la mayoría de los genotipos provenientes del estado de Chiapas se concentraron en el grupo uno. Este patrón geográfico podría estar relacionado con las características reproductivas de las especies en esta región, lo que sugirió la posibilidad de un flujo genético entre las poblaciones, un fenómeno que puede ser explicado por los mecanismos de reproducción de las especies dentro del género *Rubus*. Este flujo de genes podría estar facilitando la variabilidad genética observada entre los genotipos, tal como se ha planteado en estudios previos sobre la reproducción y hibridación en este género (Wang et al., 2018).

Resultado del análisis de coordenadas principales (PCA; Figura 30), que permitió visualizar una clara diferenciación entre los genotipos, los cuales se agruparon en cuatro categorías distintas. Sin embargo, es importante destacar que no es posible concluir que la formación de estos grupos esté directamente relacionada con el lugar de origen de los genotipos, ya que no se observó una correspondencia clara entre la geografía y la agrupación molecular. De igual manera, no se puede atribuir esta diferenciación a las características morfológicas observadas en los genotipos, salvo en el caso del grupo tres (representado en azul), donde se pueden notar características morfológicas similares entre los individuos que lo componen. Este grupo, además, presenta el

mismo nivel de ploidía, lo cual podría indicar una mayor uniformidad genética dentro de este conjunto.

En cuanto al grupo dos, formado por un genotipo de Chiapas, otro de Veracruz y uno más de Hidalgo, se observó que la característica morfológica más relevante que comparten estos tres genotipos es la forma de la espina, la cual resultó ser muy similar entre ellos. Este hallazgo coincidió con lo reportado por Marulanda et al. (2012a), quienes mencionaron la importancia de la forma de la espina como una característica distintiva en la diferenciación de genotipos dentro del género *Rubus*. Este tipo de características morfológicas podría ser un factor clave para la clasificación de los genotipos, aunque el análisis molecular revela una complejidad mayor en la diferenciación entre los grupos.

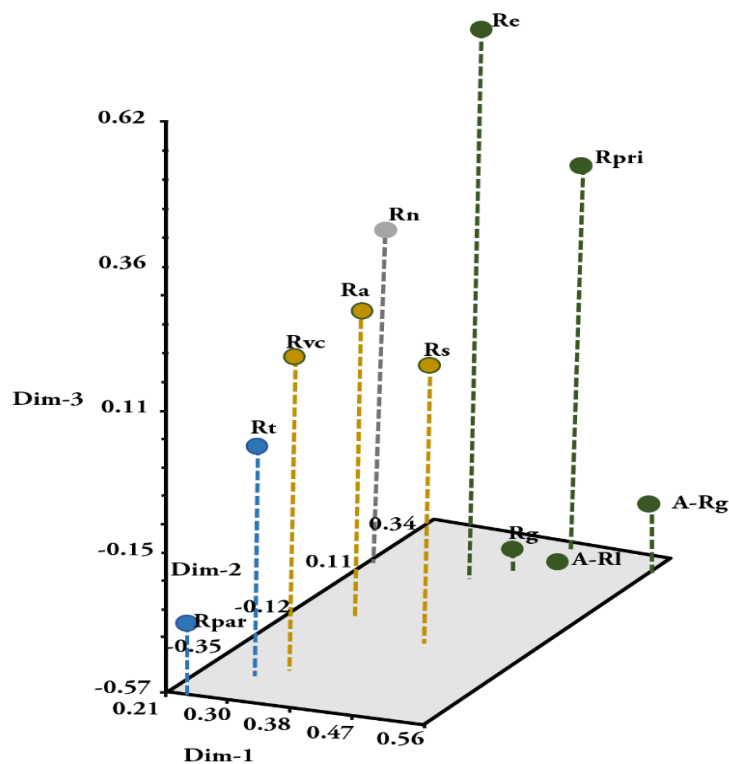


Figura 30. Gráfica tridimensional de coordenadas principales SSR, que muestra las relaciones genéticas entre especies de *Rubus*. *R. pringlei* (Rpri), *R. aff. Liebmannii* (A-Rl), *R. aff. glaucus* (A-Rg), *R. eriocarpus* (Re), *R. adenotrichus* (Ra), *R. glaucus* (Rg), *R. sapidus* (Rs), *R. Veracruz Vigos* (Rcv), *R. nievus*, *R. trilobus* (Rt) y *R. parviflorus* (Rpar).

3.3.3 Comparacion de los dendrogramas ISSR y SSR

Se encontraron diferencias significativas en la formación del dendrograma cuando se compararon los análisis realizados con los marcadores ISSR y SSR. En el caso del análisis de ISSR, el primer grupo estuvo compuesto por seis genotipos, mientras que en el análisis realizado con SSR, este mismo grupo estuvo formado por cinco genotipos, cuya diferencia fue principalmente por la presencia del genotipo Ra, el cual se encontró en el grupo dos en el dendrograma de SSR esta es la única diferencia que se observó, ya que en los grupos tres y cuatro de ambos dendrogramas se localizaron los mismos genotipos, lo que sugiere una alta concordancia en la agrupación molecular entre ambos métodos.

Este hallazgo coincidió con lo encontrado por Samriti et al. (2017), quienes confirmaron la eficacia de las herramientas moleculares utilizadas, particularmente los marcadores ISSR y SSR, para diferenciar genotipos dentro del género *Rubus*. La efectividad de estos marcadores se debe a sus distintas características: mientras que los marcadores SSR tienen una naturaleza codominante, lo que les permite detectar alelos distintos en cada genotipo, los marcadores ISSR son dominantes, lo que les permite abarcar una mayor cantidad de regiones del genoma. Esto fue corroborado por otros estudios, como los de Cai et al. (2019) y Yoon et al. (2020), quienes también destacaron las ventajas de usar estos tipos de marcadores para el análisis genético de especies dentro de la familia de las Rosáceas, dado que permiten obtener una visión más completa de la variabilidad genética presente en los genotipos estudiados.

3.4 CONCLUSIÓN

El análisis molecular realizado confirmó la gran diversidad genética presente en los genotipos de *Rubus* spp. estudiados. Los marcadores ISSR demostraron ser altamente efectivos en la identificación de polimorfismos, mientras que los SSR complementaron estos resultados con un análisis detallado de la estructura

genética. Este enfoque combinado demostró ser particularmente útil para superar las limitaciones de los análisis morfológicos.

La formación de grupos genéticos no siempre se relacionó con la geografía o la morfología, sugiriendo que los procesos evolutivos y reproductivos del género *Rubus*, como la hibridación y la poliploidía, juegan un papel determinante en su variabilidad. Este hallazgo refuerza la necesidad de emplear herramientas moleculares para la clasificación y conservación de estas especies.

En conclusión, este estudio proporcionó una base sólida para futuras investigaciones en genética y mejoramiento de *Rubus* spp., y ofrece estrategias para la conservación de su diversidad genética y el desarrollo de nuevos cultivares adaptados a las demandas agrícolas y ecológicas.

3.4 LITERATURA CITADA

- Ahmed, A., Wang, H., & Song, Y. (2021). Genetic diversity and population structure of *Rubus* spp. assessed with SSR markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 96(1), 45-54. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1855432>
- Alarcón, P., Torres, M., Pozo, G., Erazo, M., Ortega, M., Rojas, E., Leon, A. (2021). Evaluación de marcadores microsatélites (SSRs) heterólogos en *Rubus niveus* para estudios de diversidad genética en las Islas Galápagos. *ACI Avances En Ciencias E Ingenierías*, 13(2), 20. <https://doi.org/10.18272/aci.v13i2.2293>
- Alice, L., & Campbell, C. (1999). Phylogeny of *Rubus* (rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American journal of botany*, 86(1), 81–97.
- Amenduni, M., Colella, C., D'Amico, M., Bubici, G., & Cirulli, M. (2004). Strawberry breeding for resistance to *Verticillium wilt*. *Acta horticulturae*, 649, 69–72. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2004.649.10>

- Cai, Y.-L., Gao, T.-X., Li, B.-B., Wan, T., & Feng, Y. (2019). Genetic diversity of wild *Prunus pseudocerasus* populations from China based on SSR markers. *Acta horticulturae*, 1235, 61–70. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1235.8>
- Chen, Q., Wang, H., Nan, L., Zhang, H., & Wang, X. (2015) “Meiotic configuration and rDNA distribution patterns in six *Rubus taxa*”, *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 75(2), doi: 10.5958/0975-6906.2015.00037.1.
- Debnath, S., Khanizadeh, S., Jamieson, A., & Kempler, C. (2008). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(2), 313–322. <https://doi.org/10.4141/cjps07088>
- Dotor-Robayo, M., González-Mendoza, L., Castro, M., Morillo-Coronado, A., & Morillo-Coronado, Y. (2016). análisis de la diversidad genética de la mora (*Rubus* spp.) en el departamento de BOYACÁ. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 10. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)10-17](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)10-17)
- Doyle, J., & Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Efron, B. (1979). *Bootstrap methods: Another look at the jackknife*. The Annals of Statistics, 7(1), 1–26.
- Garrido, P., Morillo, E., & Vásquez, W. (2020). Genetic diversity of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) in Ecuador assessed by AFLP markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 18. 1-8. 10.1017/S1479262120000283
- Goulão, L., & Oliveira, C. (2001). Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122, 81–89. <https://doi.org/10.1023/A:1012691814643>

- Gower, J. C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 53 (3-4), 325-338. <https://doi.org/10.1093/biomet/53.3-4.325>
- Graham, J., Smith, K., Woodhead, M., & Russell, J. (2004). Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 250–252. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00203.x>
- Guasmi, F., Elfalleh, W., Hannachi, H., Fères, K., Touil, L., Marzougui, N., Triki, T., & Ferchichi, A. (2012). The use of ISSR and RAPD markers for genetic diversity among south *Tunisian barley*. *ISRN Agronomy*, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/952196>
- Khachtib, Y., Bouda, S., Ait Bella, Y., Zinelabidine, L., & Haddioui, A. (2023). Use of ISSR markers for assessing genetic diversity of apple (*Malus x domestica*) cultivars growing in Morocco. *Vegetos (Bareilly, India)*, 37(4), 1619–1626. <https://doi.org/10.1007/s42535-023-00712-3>
- Marulanda, M., López, A., & Uribe, M. (2012a). Molecular characterization of the Andean blackberry, *Rubus glaucus*, using SSR markers. *Genetics and molecular research: GMR*, 11(1), 322–331. <https://doi.org/10.4238/2012.February.10.3>
- Marulanda, M., López, A., & Uribe, M. (2012). Genetic diversity and transferability of *Rubus* Microsatellite Markers to South American *Rubus* Species. 10.5772/32838
- Meng, R., & Finn, C. (2002). Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 127(5), 767–775. <https://doi.org/10.21273/jashs.127.5.767>
- Mimura, M., Mishima, M., Lascoux, M., & Yahara, T. (2014). “range shift and introgression of the rear and leading populations in two ecologically

- distinct rubus species”, *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 209. doi: 10.1186/s12862-014-0209-9.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., & Arús, P. (2005). Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, 5, 531-535.
- Nei, M., & Li, W., (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Samriti, K., Chaudhary, S., Vaidya, E., Poonam, T., & Kumar, K. (2017). assessment of genetic diversity in *Rubus ellipticus* (Smith) using molecular markers. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 92. 10.16943/ptinsa/2017/49120.
- Sedighi, E., & Rahimmalek, M. (2015). Evaluation of genetic diversity of *Rubus hyrcanus* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and morphological markers. *Biologia* 70, 339–348 <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0039>
- Sokal, R., & Michener, C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38, 1409-1438.
- Sokal, R., & Sneath, P. (1963). Principles of Numerical Taxonomy. WH Freeman.
- Wang, X., Chen, H., & Li, J. (2018). Application of SSR and ISSR markers in genetic diversity studies of *Rubus* spp. *Biochemical Genetics*, 56(3), 245-258. <https://doi.org/10.1007/s10528-018-9832-4>
- Wu, Y., Zhang, X.-C., Sun, J.-B., Wu, X., Li, Y.-Y., Gu, W., Wang, D.-Y., Liu, J.-G., & Hu, Y.-L. (2014). Chemical constituents from the leaves of *Ilex urceolatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54, 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.01.002>

Yoon, J., Kim, H., & Lee, J. (2020). Development of microsatellite markers and genetic diversity analysis in *Rubus idaeus*. *Horticulture Research*, 7, 64.
<https://doi.org/10.1038/s41438-020-0302-6>

CAPÍTULO IV. CORRELACIÓN DE ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE ONCE GENOTIPOS DE *Rubus* spp.

RESUMEN

La caracterización de cultivos y especies silvestres es un aspecto clave de la investigación agronómica y biológica. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la correlación entre los análisis morfológicos y moleculares en 11 genotipos de *Rubus* spp. (10 especies silvestres y una variedad comercial) colectados en Chiapas, Veracruz, Hidalgo y Texcoco. Los rasgos morfológicos se registraron con base en 16 descriptores cualitativos relacionados con características de tallo y hoja, mientras que los análisis moleculares utilizaron marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) para evaluar la diversidad genética. El estudio integró estos enfoques para comprender mejor la estructura genética y las relaciones entre los genotipos. El análisis morfológico agrupó los genotipos en cuatro conglomerados mediante UPGMA, basándose en rasgos como la pubescencia, las antocianinas en tallos y hojas, y la torsión foliar. El análisis molecular mediante marcadores ISSR identificó 204 bandas polimórficas con un 100 % de polimorfismo. Las comparaciones de dendrogramas revelaron diferencias en la agrupación, como la agrupación de *Rubus glaucus* (Rg), Afín *Rubus glaucus* (ARg) y *Rubus eriocarpus* (Re) a nivel molecular, en consonancia con hallazgos anteriores sobre su parentesco genético. La prueba de Mantel mostró una correlación positiva ($r = 0.585$, $P < 0.001$) entre los datos morfológicos y moleculares, confirmando la complementariedad de estos enfoques.

Palabras clave: Clasificación taxonómica, flujo génico, plasticidad fenotípica, relaciones filogenéticas.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Diana Yaret Tierrablanca Plaza

Dirección: Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

CHAPTER IV. CORRELATION OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSES OF ELEVEN GENOTYPES OF *Rubus* spp.

ABSTRACT

The characterization of crops and wild species is a key aspect of agronomic and biological research. This study aimed to evaluate the correlation between morphological and molecular analyses in 11 genotypes of *Rubus* spp. (10 wild species and one commercial variety) collected in Chiapas, Veracruz, Hidalgo, and Texcoco. Morphological traits were recorded based on 16 qualitative descriptors related to stem and leaf characteristics, while molecular analyses used ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers to assess genetic diversity. The study integrated these approaches to better understand the genetic structure and relationships among genotypes. Morphological analysis grouped the genotypes into four clusters using UPGMA, based on traits such as pubescence, anthocyanins in stems and leaves, and leaf twisting. Molecular analysis using ISSR markers identified 204 polymorphic bands with 100% polymorphism. Dendrogram comparisons revealed differences in clustering, such as the grouping of *Rubus glaucus* (Rg), similar *Rubus glaucus* (ARg), and *Rubus eriocarpus* (Re) at the molecular level, consistent with previous findings on their genetic relatedness. The Mantel test showed a positive correlation ($r = 0.585$, $P < 0.001$) between morphological and molecular data, confirming the complementarity of these approaches.

Keywords: Taxonomic classification, gene flow, phenotypic plasticity, phylogenetic relationships.

4.1 INTRODUCCIÓN

La caracterización de cultivos y especies silvestres es un aspecto crucial en la investigación agronómica y biológica. Entre los enfoques más utilizados, la caracterización morfológica y molecular se destacan como métodos complementarios para comprender la diversidad genética, la estructura de las poblaciones y las relaciones filogenéticas de diversas especies. En el género *Rubus*, conocido por su complejidad taxonómica, estas herramientas han sido fundamentales para superar las limitaciones de los enfoques tradicionales basados únicamente en morfología (Meng & Finn, 2002).

Tradicionalmente, la caracterización morfológica se ha basado en descriptores fenotípicos como la forma, el tamaño, y otras características observables, permitiendo identificar variaciones entre genotipos y establecer relaciones taxonómicas preliminares (UPOV, 2010). Sin embargo, estas características pueden estar influenciadas por la plasticidad fenotípica y las condiciones ambientales, lo que dificulta la precisión en la diferenciación entre especies (Jiang et al., 2024). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado herramientas moleculares como los marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) y SSR (Simple Sequence Repeats), que complementan y fortalecen los análisis morfológicos (Hosseinzadeh-Colagar et al., 2016; Iza et al., 2020).

Entre los marcadores moleculares, los ISSR han demostrado ser altamente efectivos para detectar polimorfismos en regiones genómicas repetitivas, proporcionando datos confiables y reproducibles para evaluar relaciones genéticas y estructura poblacional. Una de sus ventajas es que no requieren información previa del genoma, lo que los hace ideales para estudios en especies poco exploradas o silvestres como las del género *Rubus* (Miyashita et al., 2015; Vieira, et al., 2016).

La integración de datos morfológicos y moleculares ha probado ser una estrategia robusta para caracterizar la diversidad genética en *Rubus* spp. Por ejemplo, Sedighi y Rahimmalek (2015) combinaron descriptores morfológicos con ISSR en genotipos de zarzamora, identificando patrones de variabilidad

genética no detectables con métodos individuales. Del mismo modo, Fischer et al. (2021) destacaron que el uso de ISSR complementa los análisis morfológicos al revelar variaciones genéticas subyacentes, lo cual es crucial para programas de conservación y mejoramiento genético. Debido a la complementariedad antes mencionada de los marcadores moleculares y morfológicos en esta investigación el objetivo fue revisar si hay correlación entre la caracterización morfológica y molecular de once genotipos de *Rubus* spp.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 SITIO EXPERIMENTAL

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada en Chapingo, México, en los invernaderos del campo agrícola experimental del Departamento de Fitotecnia.

4.2.2 MATERIAL VEGETAL

Se estudiaron un total de 10 especies silvestres y una variedad comercial de *Rubus* L. (Cuadro 9) colectadas en Chiapas, Veracruz, Hidalgo y Texcoco estos genotipos fueron previamente identificados y caracterizados en nivel de ploidía. Se establecieron bajo condiciones de invernadero en los invernaderos del campo agrícola experimental del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cuadro 9. Genotipos, número de cromosomas y ubicación estatal de *Rubus* spp. estudiados.

Código	Especie	Procedencia	Cromosomas
Rn	<i>Rubus niveus</i>	Chiapas	42
Rg	<i>Rubus glaucus</i>	Chiapas	21
Ra	<i>Rubus adenotrichus</i>	Chiapas	14
ARg	<i>Rubus</i> aff. <i>glaucus</i>	Texcoco	35
ARI	<i>Rubus</i> aff. <i>liebmannii</i>	Chiapas	28

Rpri	<i>Rubus pringlei</i>	Chiapas	49
Re	<i>Rubus eriocarpus</i>	Chiapas	28
Rvc	<i>Rubus</i> sp. Vigas	Veracruz	42
Rs	<i>Rubus sapidus</i>	Hidalgo	84
Rt	<i>Rubus trilobus</i>	Veracruz	21
Rpar	<i>Rubus parviflorus</i>	Chiapas	21

4.2.3 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

Para la caracterización morfológica se registraron 16 variables de acuerdo a descriptores cualitativos (UPOV, 2006) que se adaptaron para obtener datos binarios. La caracterización se realizó de acuerdo con el tallo y hoja. Las variables para tallo fueron: tallo redondo, tallo acanalado, antocianinas en tallo, antocianinas en ápices, espinas en tallo, tallo puberoso, tallo con tricomas glandulares y cerosidad de tallo. Las variables foliares fueron: hojas compuestas, antocianinas en peciolo, hojas puberosas en haz, hojas puberosas en envés, torsión de la hoja, rugosidad, relieve de nervaduras hundido y espinas en el envés de la hoja.

4.2.4 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el método reportado por (Doyle & Doyle, 1987), se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y la amplificación de PCR y la electroforesis en el Laboratorio Marcadores Moleculares del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.2.5 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la ADN polimerasa utilizando las siguientes condiciones: la cuantificación del ADN se realizó en Nanodrop 8000 de Thermo Scientific, para estandarizarlo a la concentración de 30 ng μL^{-1} .

La mezcla de PCR para los ISSR y SSR tuvo un volumen total de 26 μL ; 2 μL de ADN (30 ng μL^{-1}), 15 μL de agua, 2 μL de dNTPs (5 ng μL^{-1}), 2.5 μL de amortiguador, 1.5 μL MgCl, 2 μL del oligonucleótido a 5 ng μL^{-1} y 0.2 μL de Taq ADN polimerasa.

El termociclador marca Applied Biosystems™ Veriti™ se programó para los locus ISSR (Cuadro 10) de acuerdo a la temperatura T_M (°C) específica para cada locus.

Cuadro 10 Secuencia y T_M de iniciadores ISSR usados en este estudio.

n°	LOCUS	SECUENCIA (5'-3')	T_M (°C)
1	AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGA	43
2	GT	VHVGTGTGTGTGTGTGTG	48
3	CGA	DHBCGACGACGACGACGA	48
4	CCA	DDBCCACCACCACCACCA	48
5	CA	DBDCACACACACACAA	48
6	ACA	BCBACAACAACAACAACA	45
7	UBC 807	GAGAGAGAGAGAGAGAT	45
8	UBC 819	GTGTGTGTGTGTGTGTGTA	45
9	UBC831	ATATATATATATATATYA	42
10	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCRT	43
11	UBC855	ACACACACACACACACYT	43
12	UBC856	ACACACACACACACACYA	43
13	ISSR7961	GAGAGAGAGAGAGAGAC	42
14	ISSR2	CACACACACACACACAAAGCT	42
15	ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	42
16	ISSR4	AGAGAGAGAGAGAGAGCTC	42
17	ISSR5	ACACACACACACACACTA	42
18	ISSR6	ACACACACACACACACTG	42

Las designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); R (A ó G); D (G ó A ó T); Y (C ó T); V (G ó A ó C).

4.2.6 Visualización de los productos amplificados en el PCR

Los productos amplificados para ISSR se corrieron en electroforesis horizontal, en geles de agarosa a una concentración del 2 % con amortiguador TAE 0.5X. Se cargó 8 µL del producto amplificado y 4 µL de buffer de carga LB al 1X se corrió a un voltaje de 110 voltios, se visualizaron en el transilumador con ayuda del software VisionWorks®.

4.2.7 Análisis estadísticos

A partir de los descriptores morfológicos se generó una matriz binaria para evaluar la similitud utilizando el programa estadístico FREETREE.EXE con el coeficiente de similitud “Simple Matching” (Sokal & Sneath, 1963), y se aplicó el método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética, UPGMA (Sokal & Michener, 1958) y se calculó un remuestreo “Bootstrap” mediante el método de Jackknife usando 1000 repeticiones (Efron, 1979).

De la matriz básica de datos de frecuencias de cada fragmento, donde se consideró un locus independiente en dominancia completa con dos alelos, con la presencia el fenotipo dominante, la base de datos fue procesada con ayuda del programa NTSYSpc 2.2, se calculó un dendrograma aplicando el método de Nei-Li (1979), índice de similitud de Dice, con 1000 repeticiones con remuestreo por repetición.

Finalmente, con NTSYSpc 2.2 a partir de las matrices de similitud de los datos morfológicos y moleculares, se realizó una comparación matricial para calcular la prueba de Mantel de 2 vías. Utilizada para calcular la bondad de ajuste del análisis de conglomerados, comparando la matriz de valores cofenéticos con una matriz de disimilitud (Smouse et al., 1986).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Comparación de dendrogramas molecular y morfológico.

En los dendrogramas generados (Figura 31) se encontró que para el análisis morfológico el primer grupo se formó con ARg, Rpri, ARI, Rg, Re y Rs. En este grupo se complica identificar la característica específica que permite agrupar a estos genotipos, al observar cada individuo no se detectó una característica en específica que sea compartida o no por todos los genotipos que forman el grupo. Para el segundo grupo, formado por Re y Rs, las características que podrían participar en generar la agrupación son el tallo acanalado, la presencia de antocianinas en el ápice, pubescencia en haz y la torsión de la hoja. En el tercer grupo se localizaron los genotipos Rn, Rvc, y Ra que compartieron las características de pubescencia en envés, ausencia de antocianinas en ápice, rugosidad en la hoja y el relieve unido de las nervaduras. Finalmente, el grupo cuatro, compuesto por Rpar y Rt, comparte características de forma de tallo, antocianinas en ápice, ausencia de espinas y forma de la hoja. Esto sugiere que las características cualitativas analizadas aportan información pertinente, en línea con lo señalado por Xiong et al. (2019), quienes afirmaron que las variaciones observadas en los caracteres ofrecen datos útiles para la delimitación de especies.

Standley y Steyermark (1976) encontraron que *R. glaucus* y *R. eriocarpus* como especies estrechamente relacionadas, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en este análisis morfológico, donde estas especies se agrupan en clados diferentes. Este hallazgo sugiere que las características morfológicas evaluadas podrían estar influenciadas por factores adicionales que no fueron considerados en el estudio previo, como las condiciones ambientales o la plasticidad fenotípica de las especies.

Por otro lado, no es posible determinar una característica específica que tenga mayor relevancia en la agrupación de las especies analizadas, ya que los descriptores cualitativos parecen contribuir de manera conjunta a la delimitación

de los grupos. Este comportamiento es consistente con la formación de clados bien definidos observada en el dendrograma, lo que refuerza la utilidad de los descriptores cualitativos en la evaluación de materiales genéticos promisorios. Tal como lo mencionaron Cancino-Escalante et al. (2011), estos descriptores resultan herramientas valiosas para identificar y clasificar genotipos con potencial para futuros estudios o aplicaciones.

En el primer grupo del dendrograma molecular se observa una variación notable en los genotipos, ya que en lugar de Rs se encuentra Ra. Este resultado sugiere una diferencia molecular significativa que podría estar influenciada por factores genéticos específicos o por posibles errores en la clasificación inicial. Por su parte, el segundo grupo se caracteriza por la inclusión del genotipo Rvc, lo cual indica que, a nivel molecular, Rvc es más similar a Rs, a pesar de que ambas especies no presentan características morfológicas tan parecidas. Esta discrepancia resalta la importancia de complementar los análisis moleculares con los morfológicos para lograr una comprensión más precisa de las relaciones entre los genotipos.

En el tercer grupo, se identificaron Rpar y Rt, que, al igual que en el dendrograma morfológico, se encuentran formando el grupo cuatro. En este caso, se observó una mayor concordancia entre las características morfológicas y moleculares, lo que genera interrogantes adicionales sobre las posibles relaciones entre estas especies. Es particularmente interesante que el genotipo Rt provenga de Veracruz, mientras que Rpar es originario de Chiapas, y que, según lo indicado por Lawrence (2012), Rpar también tiene su distribución en el sur de Florida. Este patrón sugiere la posibilidad de un flujo de genes entre especies de *Rubus*, lo cual podría estar relacionado con el mecanismo de reproducción de estas plantas, tal como lo explicaron Dotor-Robayo et al. (2016). Estos hallazgos han planteado nuevos retos para entender la dinámica genética y la adaptación de las especies en diferentes regiones.

En el caso del cuarto grupo, se observó que Rn se encuentra aislada por completo de los genotipos con los que previamente se había agrupado en el

dendrograma morfológico. Esto sugirió que, a nivel molecular, Rn es significativamente diferente de los demás genotipos cuando se utilizaron los marcadores ISSR en el análisis. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Miyashita et al. (2015), quienes destacaron que los ISSR son herramientas ideales para estudios genéticos en especies poco exploradas o silvestres, como es el caso de *Rubus* spp.

Un aspecto relevante de este análisis es que, a diferencia del dendrograma morfológico, aquí se agrupan en un mismo clado Rg, ARg y Re. Este resultado concuerda con lo señalado por Standley y Steyermark (1976), quienes mencionaron la proximidad y relación entre estas especies. A nivel molecular, los datos obtenidos con los SSR utilizados en este estudio respaldaron dicha relación, y proporcionaron evidencia adicional de la similitud genética entre estos genotipos.

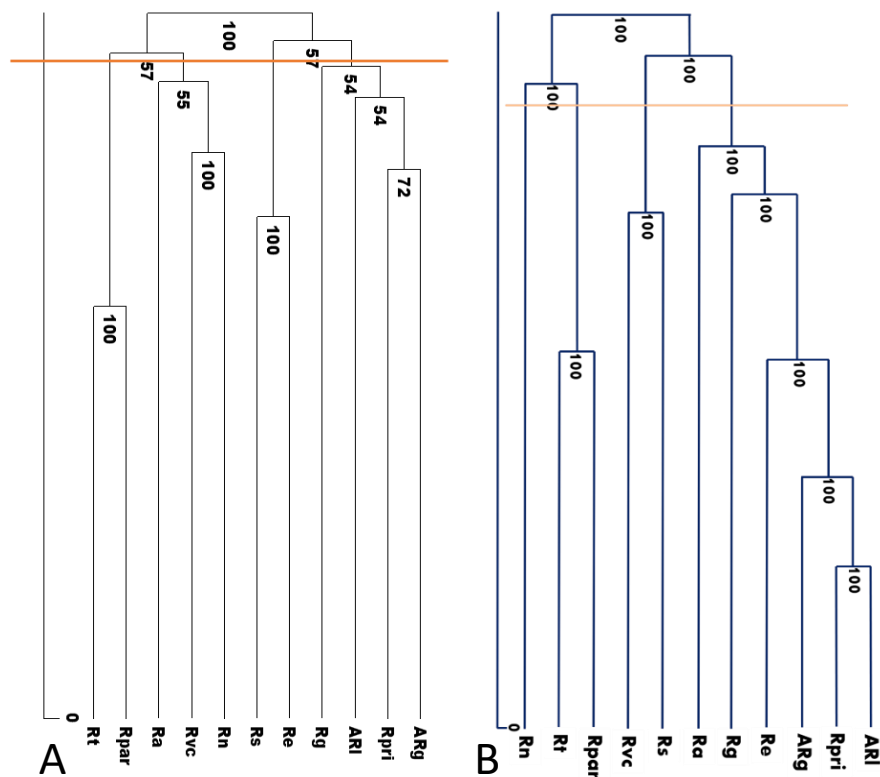


Figura 31. Dendrogramas de relaciones entre especies de *Rubus* obtenidos mediante A) análisis morfológico y B) análisis molecular. *R. pringlei* (Rpr), *R. aff. liebmanni* (ARI), *R. aff. glaucus*

(ARg), *R. eriocarpus* (Re), *R. adenotrichus* (Ra), *R. glaucus* (Rg), *R. sapidus* (Rs), *R. sp.* Vigas comercial (Rcv), *R. nieveus*, *R. trilobus* (Rt) y *R. parviflorus* (Rp).

4.3.2 Prueba de Mantel

De acuerdo con la prueba de Mantel, se observó un consenso entre las matrices de similitud obtenidas a partir de los datos morfológicos y moleculares, reflejado en un coeficiente de correlación positivo de 0.585. Este valor indica que existe una congruencia del 58 % entre las variables morfológicas analizadas y los marcadores ISSR utilizados en el estudio. Además, la prueba de distribución t arrojó un valor de 0.001, lo que respaldó la significancia estadística de esta correlación. Estos resultados sugieren que ambos sistemas de marcadores, cuando se emplean de manera combinada en el análisis, son herramientas adecuadas para estudiar la estructura genética de las especies evaluadas, en concordancia con lo indicado por Sedighi & Rahimmalek (2015).

Es importante destacar que este enfoque metodológico ha demostrado ser funcional en el análisis de otras especies y variedades. Por ejemplo, ha sido utilizado con éxito en el estudio de la diversidad genética de *Citrus reticulata* L., así como en razas de maíz, tal como lo documentan Beyene et al. (2005) y Orduz-Rodríguez et al. (2012). Estos antecedentes confirmaron la validez y aplicabilidad de combinar datos morfológicos y moleculares.

4.4 CONCLUSIÓN

En conclusión, la combinación de la caracterización morfológica y molecular con ISSR ofrece una estrategia robusta para comprender la complejidad genética y la relación entre genotipos en distintos contextos biológicos y así estudiar la diversidad genética de genotipos silvestres. Este enfoque integrado no solo permitió identificar variaciones fenotípicas y genotípicas, sino que también contribuyó a la comprensión de los mecanismos evolutivos y al desarrollo de estrategias de conservación más efectivas. Los resultados reforzaron la importancia de un enfoque multidisciplinar para abordar los retos taxonómicos de las especies silvestres. Esta metodología no sólo hace avanzar nuestra

comprensión de la diversidad genética, sino que también apoya el desarrollo de estrategias más eficaces de conservación y mejora genética.

4.5 LITERATURA CITADA

Beyene, Y., Botha, M., Myburg, A. (2005). A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. *African Journal of Biotechnology* 4, 586-595.

Cancino-Escalante, G., Sánchez-Montaña, L., Quevedo-García, E., & Díaz-Carvajal, C. (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. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc16-3.pcor>

Dotor-Robayo, M., González-Mendoza, L., Castro, M., Morillo-Coronado, A., & Morillo-Coronado, Y. (2016). análisis de la diversidad genética de la mora (*Rubus* spp.) en el departamento de Boyocá. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 10. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)10-17](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)10-17)

Doyle, J., & Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

Efron, B. (1979). *Bootstrap methods: Another look at the jackknife*. *The Annals of Statistics*, 7(1), 1–26.

Fischer, G., Miranda, D., Magnitskiy, S., Balaguera-López, H., & Molano, Z. (Eds.) (2021). *Avances en el cultivo de las berries en el trópico*. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Hosseinzadeh-Colagar, A., Haghighatnia, J., Amiri, Z., Mohadjerani, M., & Tafrihi, M. (2016). Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3), 167–174.

- Iza, M., Viteri, P., Hinojosa, M., Martínez, A., Sotomayor Correa, A., & Viera, W. (2020). Diferenciación morfológica, fenológica y pomológica de cultivares comerciales de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Enfoque UTE*, 11(2), 47–57. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.529>
- Jiang, L., Li, X., Lyu, K., Wang, H., Li, Z., Qi, W., Zhang, L., & Cao, Y. (2024). Rosaceae phylogenomic studies provide insights into the evolution of new genes. *Horticultural Plant Journal*, 11(1), 389-405 <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.02.002>
- Lawrence, A. A. (2012). *Rubus parviflorus*. Jepson Flora Project (eds.), *Jepson eFlora*. University of California, Berkeley. https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=42108, accessed on October 14, 2024.
- Meng, R., & Finn, C. E. (2002). Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(5), 767–775. <https://doi.org/10.21273/JASHS.127.5.767>
- Miyashita, T., Kunitake, H., Yotsukura, N., & Hoshino, Y. (2015). Assessment of genetic relationships among cultivated and wild *Rubus* accessions using AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 193, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.004>
- Nei, M., & Li, W., (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Orduz-Rodríguez, J., Monroy, J., Barrera, S., Núñez, V., & Ligarreto, G. (2012). Caracterización morfo-agronómica y molecular de mandarina ‘Arrayana’ en el piedemonte del Meta (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(1), 5–12. https://doi.org/10.21930/rcta.vol13_num1_art:234

- Sedighi, E., & Rahimmalek, M. (2015). Evaluación de la diversidad genética de *Rubus hyrcanus* utilizando la técnica de repetición de secuencias simples (ISSR) y marcadores morfológicos. *Biología*, 70, 339–348. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0039>
- Smouse, P. E., Long, J. C., & Sokal, R. R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, 35(4), 627–632. <https://doi.org/10.2307/2413122>
- Sokal, R., & Michener, C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409-1438.
- Sokal, R., & Sneath, P. (1963). Principles of numerical taxonomy. *Taxon*, 12(5), 190-199. <https://doi.org/10.2307/1217562>.
- Standley, P. C., & Steyermark, J. A. (1976). *Flora de Guatemala. Fieldeana*, 24(12), 1-454. Sitio web: <http://www.archive.org/>
- UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). (2010). *Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity, and stability*. UPOV.
- Vieira, M., Santini, L., Diniz, A., & Munhoz, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312–328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
- Xiong, X.-H., Zhou, X.-M., Li, M., Xu, B., Deng, H.-N., Yu, Q., & Gao, X.-F. (2019). Pollen morphology in *Rubus* (Rosaceae) and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 305(8), 705–716. <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01600-7>

CONCLUSIONES GENERALES

La diversidad genética y la variación morfológica dentro de *Rubus* spp. se caracterizaron eficazmente con la combinación de marcadores ISSR y SSR, y mostró las fortalezas de las herramientas moleculares para resolver las complejidades taxonómicas.

La variabilidad en los niveles de ploidía, que van de diploide a dodecaploide, pone de relieve los mecanismos evolutivos y adaptativos que contribuyeron a la diversidad del género. La poliploidía y la hibridación se identificaron como impulsores clave de la especiación en *Rubus* spp.

Este enfoque integrado proporcionó una base sólida para futuros estudios destinados a conservar los recursos genéticos y desarrollar cultivares mejorados, garantizando la sostenibilidad y el potencial económico de *Rubus* spp. en diversos sistemas agrícolas.