



Universidad Autónoma Chapingo



Departamento de Fitotecnia

Instituto de Horticultura

**HERENCIA FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE CRUZAS
INTERESPECÍFICAS DE *Rubus* spp.**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

CHRISTIAN CAMILO CASTAÑEDA CARDONA

Bajo la supervisión del Dr. Juan Martínez Solís



APROBADA



Chapingo, Estado México, noviembre de 2021.

**HERENCIA FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE CRUZAS
INTERESPECÍFICAS DE *Rubus* spp.**

Tesis realizada por **Christian Camilo Castañeda Cardona** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____



Dr. Juan Martínez Solís

ASESOR: _____



Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego

ASESOR: _____



Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
RESUMEN GENERAL.....	x
GENERAL ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	12
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. Cultivo de mora y su importancia.....	15
2.2. <i>Rubus glaucus</i> Beth.....	16
2.3. Variedad Tupy	17
2.4. <i>Rubus niveus</i>	17
2.5. Mejoramiento genético.....	18
2.6. Marcadores genéticos.....	20
2.6.1 Marcadores morfológicos	20
2.6.2 Marcadores moleculares	21
2.7. Literatura citada	23
3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE CRUZAS INTERESPECÍFICAS DE <i>Rubus</i> spp CON MARCADORES ISSR	27
3.1. Resumen	27
3.2. Abstract.....	28
3.3. Introducción	29
3.4. Materiales y métodos.....	31
3.4.1. Material vegetal	31
3.4.2. Extracción de ADN y amplificación de marcadores ISSRs.....	32

3.4.2. Análisis estadístico	34
3.5. Resultados y discusión	34
3.6. Conclusiones	40
3.7. Literatura citada	41
4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CRUZAS INTERESPECÍFICAS DE <i>Rubus</i> spp.....	44
4.1. Resumen	44
4.2. Abstract.....	45
4.3. Introducción	46
4.4. Materiales y métodos.....	47
4.4.1. Obtención de semilla	47
4.4.2. Germinación	47
4.4.3. Caracterización morfológica	48
4.4.4. Análisis estadístico	49
4.5. Resultados y discusión	50
4.5.1. Caracteres morfológicos cualitativos	50
4.5.2. Estadísticos descriptivos de los caracteres morfológicos cuantitativos	51
4.5.3. Análisis de Componentes Principales	53
4.5.4. Análisis de agrupamiento de todas las variables.....	56
4.5.6. Pruebas de χ^2	58
4.6. Conclusiones	59
4.7. Literatura citada	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Progenitores y progenie de <i>Rubus</i> spp. usados en la caracterización molecular con ISSRs.	32
Cuadro 2. Iniciadores usados en la técnica de ISSRs para caracterización molecular de <i>Rubus</i> spp..	34
Cuadro 3. Número de bandas, número y porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad estimada (He), coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) de 15 iniciadores ISSR evaluados (SD de 0.095).	35
Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre y dentro de los grupos utilizando 15 marcadores ISSRs ($P \leq 0.001$).	40
Cuadro 5. Descriptores morfológicos vegetativos para la F_1 de cruzas de <i>R. glaucus</i> x <i>R. niveus</i> ; <i>R. glaucus</i> x var. Tupy y los respectivos progenitores.	48
Cuadro 6. Valores mínimos (Min), máximos (Máx), medios, desviaciones estándar (SD) y coeficientes de variación (CV %) de los rasgos morfológicos de las variables cuantitativas evaluadas en genotipos de <i>Rubus</i> spp.	52
Cuadro 7. Valores propios y proporción de la varianza explicada por Análisis de Componentes Principales (ACP).	54
Cuadro 8. Vectores propios de los primeros cinco componentes principales en la caracterización morfológica de genotipos de <i>Rubus</i> spp.	55
Cuadro 9. Prueba de χ^2 para presencia de espinas en los híbridos de la F_1 de <i>R. glaucus</i> x <i>R. niveus</i> y <i>R. glaucus</i> x Var. Tupy ($P < 0.05$).	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dendrograma de la estructura genética de 37 individuos de <i>Rubus</i> spp. basado en el coeficiente de Nei –Li y calculado de los datos combinados de 15 marcadores ISSR.....	39
Figura 2. Dendrograma obtenido con el método UPGMA usando el programa TFPGA para los tres grupos evaluados. Grupo 1) progenitores. Grupo 2) plantas procedentes de la cruce <i>R. glaucus</i> x <i>R. niveus</i> Grupo 3) Plantas procedentes de la cruce <i>R. glaucus</i> x Var. Tupy.	39
Figuras 3 y 4. Ausencia y presencia de espinas en los híbridos de cruces interespecíficas de <i>Rubus</i> spp.	51
Figura 5. Medidas de correlaciones para variables cuantitativas en materiales de <i>Rubus</i> spp.....	56
Figura 6. Dendrograma de distancia entre descriptores morfológicos de 59 accesiones de <i>Rubus</i> spp.....	57

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Jaime Castañeda Mendoza y Nancy Cardona Holguín, que, con amor, apoyo y la confianza depositada en mí me permiten dar este paso más cerca a la meta de conquistar el nivel doctoral. A mis abuelos Raúl José Castañeda G. y Fanny Mendoza de Castañeda por su tiempo y dedicación, sin ustedes no sería ni una pequeña parte de lo que soy y donde estén sé que estarán orgullosos de mis logros y aún mantengo la promesa que me verán desde el cielo y acompañándome en espíritu el obtener el título de Maestría y posteriormente el de Doctorado.

A mi hermano, mis tías y tíos, primos y demás familiares por su compañía y momentos compartidos, sé que para ustedes este también es su logro.

A las doctoras Ana Cruz Morillo y Yacenia Morillo las hermanas “morita” por su tiempo y conocimientos en la orientación de este trabajo, gracias por ser mis mentoras, por su experiencia y amistad.

A mis amigos de la Universidad Autónoma Chapingo, mis compañeros docentes que desde Colombia estuvieron pendientes de mí y sé que disfrutan y se alegran por esta meta alcanzada.

Por último, y no menos importante, a Dios por darme la oportunidad de hacer parte de la familia “Chapinguera” y conocer a personas tan talentosas y con la calidez humana que caracteriza al pueblo mexicano.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo y el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia, por darme la oportunidad de formar parte de tan prestigioso programa de posgrado, por la disponibilidad de sus instalaciones del campo agrícola experimental y del laboratorio de Marcadores Moleculares para el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Juan Martínez Solís por su apoyo incondicional, sus enseñanzas y orientaciones en la investigación. Además, por su gran corazón, lo excelente anfitrión y por en hacerme sentir que México es mi otro hogar.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego, por su apoyo, su tiempo y disponibilidad en todo el proceso de la investigación. Sus aportes fueron fundamentales desde el inicio de la tesis hasta su culminación.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por sus enseñanzas, sus observaciones y recomendaciones que aportaron en mejorar esta investigación.

A la Dra. Yacenia Morillo y la Dra. Ana Cruz Morillo por su apoyo incondicional en este proceso, sus tips y explicaciones en las temáticas para el trabajo en el laboratorio y en la elaboración del documento final.

A la M. C. Claudia Reyes Quiroz por su apoyo en los análisis multivariados y su apoyo total en campo. Y a mis amigos Manuel, Jhusua, Gabriel, Kevin, Tranqui, Carito, Nelson y Dino por su entrega y colaboración en el trabajo en equipo que hicimos en estos dos años.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombres y apellidos: Christian Camilo Castañeda Cardona
Fecha de nacimiento: 23 de agosto de 1988
Lugar de nacimiento: Villavicencio-Meta / Colombia
CURP: CACC880823HNESR02
Profesión: Ingeniero Agrónomo

Desarrollo académico

Bachillerato: Escuela Normal Superior de Villavicencio
Licenciatura: Universidad de los Llanos
Posgrado: Maestría en Ciencias en Horticultura

RESUMEN GENERAL

HERENCIA FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE CRUZAS INTERESPECÍFICAS DE *Rubus* spp.

Las frutillas tienen su importancia por el valor nutricional, alta rentabilidad, incremento en la demanda mundial, entre otras cualidades. La presente investigación se realizó utilizando tres progenitores; *Rubus glaucus*, *Rubus niveus* y la variedad Tupy con cruza controlada y sus recíprocas para identificar características heredables en los híbridos resultantes. Se realizó la caracterización morfológica con 23 descriptores cuantitativos y cualitativos en 59 individuos entre padres e híbridos. Con los descriptores cuantitativos se realizó el análisis de componentes principales donde los dos primeros componentes reflejaron el 51 % de la variabilidad de la población; en cada componente los descriptores que más destacaron fueron longitud del foliolo terminal y el número de espinas. Con la evaluación de todos los descriptores se obtuvo el dendrograma donde los progenitores e híbridos se agruparon dependiendo del tipo de la cruce y la presencia o ausencia de espinas. La caracterización molecular se realizó usando 15 iniciadores tipo ISSRs, los cuales produjeron en 37 individuos 130 bandas con un 59.14 % de loci polimórficos. Con un nivel de similitud de 0.5 se formaron siete grupos dependiendo del tipo de cruce. El análisis de varianza molecular evidenció que la mayor variabilidad se encontró dentro de los grupos (como la F₁ de cada cruce) y en menor medida entre grupos. Los resultados demostraron que los marcadores ISSR son útiles y para evaluar las relaciones genéticas, polimorfismo y diversidad genética de especies de *Rubus*.

Palabras claves: Variabilidad, herencia, marcador, descriptor, zarzamora, similitud.

GENERAL ABSTRACT

PHENOTYPIC AND MOLECULAR HERITAGE OF INTERSPECIFIC CROSSES OF *Rubus* spp.

Berries are important for their nutritional value, high profitability, and increased world demand, among other qualities. This research was carried out using three parents: *Rubus glaucus*, *Rubus niveus* and the variety Tupy with controlled crosses and their reciprocals, to identify heritable characteristics in the resulting hybrids. Morphological characterization was carried out using 23 morphological quantitative and qualitative descriptors on 59 individuals including parents and hybrids. Using the quantitative descriptors, a principal component analysis was carried out where the first two components reflected 51 % of the population variability; in each component the descriptors that stand out were the length of the terminal leaflet and the number of thorns. With the evaluation of all the descriptors was obtained a dendrogram where they were grouped by parents and hybrids depending on the type of cross and the presence or absence of thorns. With the molecular characterization using 15 primers type ISSRs, it was obtained from the 37 individuals 130 bands with 59.14 % of polymorphic loci. At 0.5 similarity level seven groups were formed mainly distinguished by the type of cross. The analysis of molecular variance showed that the greatest variability is found within groups (as the F₁ of each cross and to a less extent between groups. The results demonstrated that ISSR markers are useful and powerful for evaluating genetic relationships, polymorphism, and genetic diversity of *Rubus* species.

Keywords: Variability, inheritance, marker, descriptor, blackberry, similarity.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México, por su ubicación geográfica en el planeta cuenta con diversidad de climas y ecosistemas favoreciendo la flora existente, pues cuenta con alrededor de 762 especies de frutales (Segura et al., 2018), de las cuales la familia Rosaceae es la que mayor aporte hace a esta cifra destacándose especies caducifolias como el manzano (*Malus x domestica*), el peral (*Pyrus communis* L.), el chabacano (*Prunus armeniaca* L.), el duraznero (*P. pérsica* L.), el tejocote (*Crataegus mexicana* DC), el capulín (*P. serotina*), el ciruelo (*P. domestica* L.) y especies como las frutillas entre las más destacadas la fresa (*Fragaria* L.), frambuesa (*Rubus* subg. *Idaeobatus* Focke), el arándano (*Vaccinium angustifolium*) y la zarzamora (*R.* subg. *rubus* Watson) (Brennan et al., 2014).

Desde la antigüedad el humano ha usado las especies de *Rubus* como una fuente de alimento, sin embargo, en el siglo XVI en Europa, surgen los primeros reportes de cultivos en frambuesas (Jennings, 1988), aunque los primeros en avanzar en sistemas de producción a gran escala a inicios del siglo XX son los productores en Estados Unidos de América, donde se desarrollaron los primeros cultivares de frutillas principalmente de zarzamoras y frambuesas para el consumo de frutos rojos (Brennan et al., 2014).

Las frutillas han tenido importancia económica por la demanda que existe a nivel mundial. Las propiedades biológicas como pigmentos y su capacidad antioxidante las posiciona como alimentos funcionales, consideradas como super-frutas. Su elevada rentabilidad, alto requerimiento de mano de obra, versatilidad para el consumo de frutos en fresco y procesados, rápido equilibrio económico en inversión y su potencial exportador han hecho que la nación se ubique entre los primeros productores de arándano, fresas, frambuesas y zarzamoras, y liderando las exportaciones en el mundo a países como Estados Unidos y Canadá (González-Razo et al., 2019).

El crecimiento mundial a la demanda de frutillas hizo que México aumentara el número de productores y el área de siembra que pasó de 10,684 hectáreas a

36,135 hectáreas en el año 2017. El 95 % de esta superficie cultivada se concentra en cuatro Estados (Michoacán, Jalisco, Baja California y Guanajuato) y el 96.8 % de la producción nacional (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018), las exportaciones ascendieron a 1,923.2 millones de dólares, siendo el destino principal Norteamérica con 96.9 %.

Este cultivo es muy reciente en el país pues en el año 2008 no hay registros oficiales de producción, una década después en el año 2018 se registró exportaciones de frutillas de 364,000 toneladas a 35 países (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria, 2019). Ubicándose a nivel mundial como tercer productor de arándano azul con 36,700 toneladas, en tercer lugar, en producción de fresa con 658,436 toneladas, mientras que la zarzamora se produce 270,399 toneladas, lo que colocó al país como el primer productor del mundo.

Este impulso en el incremento de las áreas de cultivo de frutillas y principalmente de zarzas, ha permitido el desarrollo de empresas dedicadas a la producción y comercialización de berries para exportación, empresas como Driscoll's, y BlueDrop, además de Aneberries la cual asocia a las primeras con otras empresas productoras de frutillas, han enfocado sus esfuerzos para posicionarse entre las mejores actividades agrícolas del país por el rápido retorno de la inversión, uso intensivo de mano de obra, versatilidad de los frutos para su consumo y su potencial exportador. Sin embargo, estudios realizados por estas empresas no son divulgados para la comunidad científica ni para el uso de pequeños productores. El mejoramiento de características deseables protegido por ellos y así, de esta manera sacan mayor provecho de la tecnología que emplean.

Además de la importancia que trae por su alta demanda, el cambio climático trae consigo problemas fitosanitarios causados por plagas y enfermedades, la reducción de productos para el manejo de plagas hace que los mejoradores tengan un gran reto en el desarrollo de plantas que toleren el estrés biótico y abiótico, sin perder la calidad del fruto y el rendimiento (Jennings, 2018).

Por estas razones las cruzas controladas entre variedades de zarzamoras y especies cercanas como la frambuesa, se realizaron para estudiar la herencia fenotípica y molecular de cruzas interespecíficas de *Rubus* spp. Con el objetivo de encontrar genotipos de interés con características deseables heredadas de sus progenitores, como la ausencia de espinas, porte de la planta, tipo de hoja y calidad de fruto, entre otras.

El presente documento contiene tres partes principales en lo que se abordará la investigación; en la primera se presenta una revisión de literatura que complementa el entendimiento de las principales características de las especies relacionadas, su origen, distribución, estudios previos en la caracterización morfológica y molecular en el género *Rubus* e importancia de la investigación.

La segunda parte se presenta un análisis de la diversidad genética de los híbridos y progenitores usando marcadores moleculares ISSRs (intersecuencias simples repetidas) donde se emplearon 15 iniciadores que generaron una matriz binaria con la que se obtuvo un dendrograma y se implementó el coeficiente de similitud de DICE para determinar la variabilidad entre los progenitores y la F₁ resultante de ambas cruzas. La tercera parte presenta el análisis de la diversidad morfológica de 59 individuos de los cuales 28 son producto de la cruce entre *R. glaucus* x *R. niveus*; 28 son resultados de la cruce entre *R. glaucus* x var. Tupy, y tres progenitores (*R. glaucus*, *R. niveus* y var. Tupy) los estadísticos descriptivos, análisis de componentes principales y análisis de agrupación en función de 23 descriptores morfológicos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cultivo de mora y su importancia

La zarzamora o mora pertenece al género *Rubus*, que con alrededor de 500 especies distribuidas en todos los continentes exceptuando a la Antártida, se constituye como uno de los géneros del reino vegetal de mayor diversidad genética (Alvarado, 2002). Este a su vez, perteneciente a la familia Rosaceae y se caracteriza por tener especies perennes, trepadoras o arbustivas y raras veces de hábito rastrero (Harling y Anderson, 1996; Shu et al., 2003). Los tallos en su mayoría presentan espinas de diferentes formas y tamaños, estípulas libres, persistentes, o a veces ausentes (Harling y Anderson, 1996).

Las hojas son caducas, generalmente compuestas e impares con tres, cinco o siete folíolos, también hay plantas con hojas simples, de forma palmeadas o pinnadas; glabras o pubescentes; las estípulas se ubican en la base del peciolo y son lanceoladas (Harling y Anderson, 1996; Shu et al., 2003).

Las Inflorescencias en las *Rubus* pueden ser cimosas, en racimos o panículas algo alargadas, en corimbos, o en varios grupos, flores simples o compuestas (Edees y Newton, 1988; Harling y Anderson, 1996). Las flores son solitarias biosexuales y completas, generalmente pentámeras, rara vez unisexuales y dioicas (Gutiérrez, 1970; Edees y Newton, 1988; Harling y Anderson 1996; Shu et al., 2003) El cáliz con cinco sépalos imbricados y persistentes; la corola, pentámera, margen entera, de coloración blanca, roja o rosada, lisas o con vellosidades (Gutiérrez, 1970; Edees y Newton, 1988; Harling y Anderson, 1996; Shu et al., 2003). El gineceo presenta carpelos libres y numerosos, cada carpelo puede presentar uno o dos óvulos donde se desarrolla uno generando un aquenio o una drupa; los estilos son filamentosos, glabros o con vellosidades, con un estigma más o menos capitado o bifido; los estambres son generalmente numerosos, algunas veces se presentan en cantidad reducida, filamentosos y

con anteras glabras (Gutiérrez, 1970; Edees y Newton, 1988; Harling y Anderson, 1996; Shu et al., 2003).

Los frutos formados por drupeolas, se agrupan formando polidrupas, donde cada una de ellas contiene una semilla, pueden mantenerse unidas al receptáculo floral para el caso de las zarzamoras y desprenderse de él para el caso de las frambuesas; las drupeolas con diversas texturas, de forma globosa y con semillas de testa delgada y membranosa (Harling y Anderson, 1996; Shu et al., 2003).

El conjunto de *Rubus* incluye doce subgéneros, de estos solo un número reducido se han domesticado (Focke, 1914). De estos los subgéneros con mayor cantidad de especies son *Idaeobatus* (frambuesas, 117 especies), *Malachobatus* (115 especies) y *Rubus* (moras, 132 especies). Este género presenta variedad de formas de reproducción como la vegetativa por medio de acodos, estolones o estacas, hasta la apomixis y aposporia (Dowrick, 1961; Abrahamson, 1975) y forma sexual por autofecundación en especies autógamas.

2.2. *Rubus glaucus* Beth

La *R. glaucus*, conocida como mora de castilla o mora andina (Antunes, 2002), cuyo origen abarca las zonas tropicales altas de América (Franco y Giraldo, 1998). Se caracteriza por tener hábito semitrepador, puede alcanzar los 3 m, sus tallos son transversalmente circulares, de coloración blanca; espinosos, las espinas son ligeramente curvas de 2 a 3 mm de longitud, se pueden encontrar en tallos, peciolo y venas principales en el envés de las hojas (Gutiérrez, 1970; Harling y Andersson, 1996). Presenta estípulas que miden entre 0.3 y 0.8 mm, los peciolo alcanzan una longitud entre 5 y 12 cm de longitud, las hojas de tres foliolos de forma ovada o lanceolada, con márgenes aserradas o biserradas, de coloración verde en el haz y blanco en el envés, ápice acuminado biserrado, con pubescencia en el envés (Gutiérrez, 1970; Harling y Andersson, 1996).

En cuanto a la parte morfológica reproductiva presenta inflorescencias de 10 a 20 cm de largas, de 15 a 22 flores y pedicelos de 1 a 4 cm de largos, sin vellosidades, fasciculados (Harling y Anderson, 1996). Las flores dispuestas en

racimos terminales y alcanzan los 18 a 22 mm de diámetro. Sépalos entre 7 y 15 deltados y entre 3 y 5 mm. Presentan 5 pétalos de 5 a 8 mm de color blanco. Los frutos por inflorescencia pueden variar entre 15 a 25, ovoides a globosos, entre 1.5 y 2 cm, por cada polidrupa pueden haber entre 70 a 100 drupeolas por receptáculo (Gutiérrez, 1970; Harling y Andersson, 1996).

Algunas moras de castilla fueron reportadas como “mora sin espinas”, cultivar que fue categorizado también como *R. glaucus*, pues todas las características son las mismas a excepción de la presencia de espinas. Esta modificación constituye una ventaja para el manejo del cultivo, ya que facilita la realización de labores culturales como tutorado, poda y cosecha (Espinosa et al., 2009). Además, se destaca por obtener rendimientos anuales de hasta 15 t·ha⁻¹. Característica que ha sido asociada a una mayor obtención de tallos reproductivos o floricañas que las primocañas (tallos vegetativos). En cuanto a frutos, los valores de tamaño y peso son similares a la *R. glaucus* con espinas (Clavijo y Pedraza, 2004 citado por Bernal y Díaz, 2006).

2.3. Variedad Tupy

‘Tupy’ es el resultado del cruzamiento entre ‘Uruguai’ x ‘Comanche’, realizado en EMBRAPA en 1982, donde la planta C.4.82.5 seleccionada de una evaluación fue la que dio origen. Las características principales de la variedad son: Plantas de porte erecto, con espinas; hojas pentafoliadas dispuestas en forma palmadas, tallo angular, produce frutos grandes con seis gramos de peso y en promedio, con coloración negra y uniforme, su sabor es equilibrado entre acidez y el azúcar, firme y consistente por lo que se puede consumir en fresco (Santos y Raseira, 1988).

2.4. *Rubus niveus*

Plantas arbustivas suberectas que puede alcanzar hasta 5 metros de altura. Tallos glabrosos, cortantes, espinosos, con espinas angostas con una base ancha que pueden medir entre 7-10 mm de largo, siendo rectas o algo curvadas. Presenta estípulas lanceoladas. Pecíolos entre 15-50 mm. Sus hojas son

imparipinadas, foliolos ovados un poco rómbicas, de 2 a 7.5 cm x 1.5 a 5 cm. subcoriáceas, base redonda, en punta aguda, biserrado, con nueve a once pares de venas secundarias.

En cuanto a las flores pueden alcanzar entre 3-7 mm de largo. Inflorescencia pueden alcanzar entre 20 a 50 flores, pedicelos 5-10 mm de largo (Romoleroux, 1996). Flores de tamaño pequeño entre los 10-15 mm de diámetro; sépalos ovadotriangulares. Fruto ovoide que pueden alcanzar los 1.5 cm; las drupeolas con tamaños hasta 4 mm, se pueden encontrar frutos con 50-80 drupeolas por receptáculo, con coloraciones que van del rosado a profundamente morado (Romoleroux, 1996), al desprender el fruto, el receptáculo queda en planta por lo que solo se desprenden las drupeolas.

2.5. Mejoramiento genético

Existe la necesidad de aumentar la oferta de materiales de siembra, iniciando con esquemas de fitomejoramiento que conduzcan a obtener variedades más productivas, con características morfológicas que faciliten las actividades agrícolas (López-Gutiérrez et al., 2019).

Las primeras formas cultivadas de frambuesa surgieron en Europa a mediados del siglo XVI, pero solo a finales del siglo XVIII se obtuvo registro de las primeras variedades (Jennings, 1988). En el siglo XX se realizaron los primeros estudios de mejoramiento genético controlado llegando al punto en que se libraron más de 100 cultivares al finalizar el siglo (Moore, 2008).

Los cultivares modernos de frambuesa y zarzamora se separan de sus progenitores silvestres solo unas pocas generaciones y su domesticación ha resultado en una reducción de la diversidad tanto morfológica como genética (Haskell, 1960), siendo esto una limitante para la producción de frutillas en el futuro, pues cada día se necesitará de cultivares con mejor calidad, con resistencia duradera a plagas y enfermedades y a condiciones ambientales adversas por efectos del cambio climático (Hall y Klemper, 2011).

Existe gran diversidad de especies en el género *Rubus*, sin embargo, especies como la frambuesa, los principales materiales usados para la obtención de cultivares han sido de *R. idaeus* (frambuesa roja) y *R. occidentalis* (frambuesa negra). De estas se han mejorado el tamaño y el rendimiento de frutos comparadas con sus parientes silvestres, desarrollándose cultivares de frambuesas rojas, negras, amarillas y moradas. El tipo morado se originó del cruce entre la frambuesa negra y roja. Las frambuesas amarillas son producidas por plantas de frambuesas rojas mutantes (Pritts, 1997). Tan solo cinco cultivares progenitores dominan la ascendencia de la frambuesa roja: 'Lloyd George', 'Pynes Royal', 'Preussen', 'Cuthbert' y 'Newburgh' (Badjakov et al., 2006).

En el caso de la zarzamora, las formas cultivadas aparecieron alrededor de 1830, y el desarrollo de 'Loganberry' en 1890 se considera el primer esfuerzo de mejoramiento en este cultivo (Swanson et al., 2011). Las zarzamoras domesticadas se dividen en 12 secciones destacándose *Allegheniensis*, *Arguti*, *Rubus* y *Ursini*. La mora de castilla o mora andina (*R. glaucus*) se encuentra en el subgénero *Idaeubatus* y *Eubatus*, depende de los autores, aunque se describe a este tipo de mora como el producto de hibridación intergenérico entre una zarzamora del subgénero *Rubus* y una mora suramericana del subgénero *Eubatus* según Darrow (1952) a esta afirmación la apoyan los estudios hechos por Jennings (1978) en pigmentos de antocianinas entre la mora andina (*R. glaucus*) y sus parentales. Estos autores afirman que la *R. glaucus* es un alotetraploide, es decir, una especie poliploide constituida por más de un tipo de genoma procedentes de dos o más especies hibridadas entre sí. Por estos antecedentes, se considera al género *Rubus* como unos de los más diversos del reino vegetal, componiéndose de especies con varios niveles de ploidía (Finn, 2008).

El mejoramiento de especies *Rubus* tienen su origen en Europa y Estados Unidos de América, es el caso de la Universidad de Arkansas como finalidad de sus planes de mejoramiento genético fue obtener genotipos con frutos firmes y grandes, desprovistos de espinas, ramas erectas y alto rendimiento (Clark et al.,

2007). Esta universidad evaluó mediante análisis de pedigree los clones originarios de la región norteamericana y la relación genética entre 32 cultivares de zarzamora encontrando que tres clones aportaron casi el 50 % de los 32 cultivares, lo que demostró una estrecha base genética (Stafne y Clark, 2004).

2.6. Marcadores genéticos

Los marcadores son cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético Rieger et al. (1982). Para Gale (1994) lo define como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en un cromosoma. Es decir, un marcador es un carácter o una secuencia de ADN que puede estar ligada a una característica y que a su vez puede usarse para indicar la presencia de otro gen en caso de haber un ligamiento; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, o característica fenotípica) que se asocie a la presencia o la expresión de una característica B (como tipo de hoja, color, altura, resistencia a enfermedades, etc.) puede considerarse como un marcador, pues la presencia de una característica implica la manifestación de la otra.

La importancia de los marcadores se concentra en la posibilidad de estudiar organismos y hacer selección de aquellos que tengan un interés particular para el humano. En ocasiones, el uso de ellos permite seleccionar los individuos aún antes de que expresen el rasgo de interés, es decir, se pueden usar a temprana edad. Gracias al empleo de marcadores ha permitido el fitomejoramiento de especies de importancia global en la alimentación de la humanidad. Hay dos tipos principales de marcadores o dos clases de marcadores genéticos: los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares (Tanksley, 1983; Nuez y Carrillo, 2000).

2.6.1 Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos se basan en la expresión de características fenotípicas. Un carácter puede estar asociado a un locus o a loci que son variantes del gen y que al expresarse puede cambiar la característica, es por esto

por lo que se utilizan como marcadores de aquellos cromosomas que los contienen. Pero al ser limitados solo analizan una pequeña parte del genoma (Pérez y Cornejo, 2014). Son utilizados como el inicio para la caracterización de plantas con el propósito del mejoramiento de cultivos y para programas de conservación de germoplasma. Estos permiten estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas e identificar recursos fitogenéticos. Este tipo de marcadores morfológicos establecen las bases para identificar y diferenciar variedades, pero presentan una serie de limitantes pues son métodos complejos, limitados, demandan tiempo, presupuesto, mano de obra calificada y subjetivos e influenciados por el ambiente, además, involucran estados de desarrollo específicos del cultivo (Yasmin et al., 2006).

Varios estudios se han realizado usando descriptores morfológicos para la caracterización de zarzamoras, principalmente en países como Colombia, Ecuador, Brasil y México, para estudios de diversidad genética, conservación de germoplasma, identificación de cultivares usados por los agricultores y en programas de mejoramiento genético.

2.6.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se basan en la diferencia de pequeñas secuencias de ADN entre individuos que permiten estudiar directamente el material genético, pero normalmente se trata de rasgos sin reflejo en el fenotipo. por otra parte, son neutros fenotípicamente y la segregación o polimorfismos son más frecuentes que los morfológicos. Se pueden usar con alguna parte del tejido vegetal en los primeros estados de desarrollo de la planta. Aparentemente están libres de efectos epistáticos y virtualmente se puede evaluar un número ilimitado de ellos (Phillips et al., 1995).

Con los marcadores moleculares se estima la diversidad genética. Existen diferentes tipos de técnicas moleculares que dan información del fragmento analizado, lo más común es detectar diferencia de tamaño; a partir de las frecuencias con que aparecen cada una de las variantes se puede estimar

diversos parámetros para comparar a individuos de una misma población o individuos de diferentes poblaciones para evaluar la diversidad. También depende de qué tipo de marcador se emplea, si son dominantes o codominantes, si son basados en la PCR o no. Si emplean o no enzimas de restricción (Collada, 2008).

Estudios previos realizados con marcadores moleculares en frutillas, han usado enzimas de restricción para estimar variación genética, tal es el caso del estudio llevado a cabo por Nybom et al. (1990). Quienes estudiaron 14 plantas de cuatro especies del género *Rubus* en frambuesas y moras. Utilizaron la sonda M13 y la técnica de minisatélites para determinar la variación inter e intraespecífica, la cual fue alta a pesar de que hubo plantas ubicadas muy cerca lo cual se explica por la propagación vegetativa por esqueje y apomixis en las especies estudiadas.

Con marcadores RAPD se implementaron para un estudio preliminar y determinar relaciones entre y dentro especies de *Rubus*. La población estudiada fueron de 24 accesiones que pertenecen a 13 especies a los subgéneros *Idaeobatus*, *Rubus* y *Anoplobatus*, con 10 primers polimórficos. Se encontró relaciones entre especies de cada subgénero, así como información sobre el origen del germoplasma (Graham y McNicol, 1995).

Los marcadores ISSRs son secuencias de ADN pequeñas y repetidas de dos a tres nucleótidos que pueden estar relacionados con algún gen. La repetición de nucleótidos no codifica para alguna proteína, pero estas secuencias se pueden recombinar y expandir más que otras secuencias, siendo más variables y útiles para calcular la similaridad entre individuos o especies relacionadas. Los polimorfismos corresponden a diferencias de la longitud de los fragmentos amplificados por un número distinto de repeticiones de la secuencia del iniciador.

En investigaciones realizadas en el Departamento de Boyacá en Colombia, estos marcadores fueron de gran utilidad para determinar la variabilidad genética de los cultivares presentes en dicha región, también se usaron en poblaciones de

Rubus en el Departamento de Norte de Santander y en las colecciones de Corpoica (ahora Agrosavia).

2.7. Literatura citada

- Abrahamson, W.G. (1975). Reproductive strategies in dewberries. *Ecology*, 56 (1), 721–726. <https://doi.org/10.2307/1935508>
- Alvarado A., L. (2002). Mora (*Rubus*). Consejo Nacional de Producción (CNP). Boletín Quincenal. 1-3. http://www.cnp.go.cr/php_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/mora_junio_2002.pdf,
- Antunes, L. E. C (2002). Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 32(1),151-158. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100026>
- Badjakov, I., Todorovska, E., Kondakova, V., Boicheva, R., & Atanasov, A. (2006). Assessment the genetic diversity of Bulgarian raspberry germplasm collection by microsatellite and RAPD markers. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14, 61-76.
- Bernal, J., & Díaz, C. (2006). Materiales locales y mejorados de tomate de árbol, mora y lulo sembrados por los agricultores y cultivares disponibles para su evaluación en Colombia. Rionegro: Corpoica. C.I. La Selva. 8-11 p. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/1225?show=full>
- Brennan, R. M., Caligari, P. D. S., Clark, J. R., Brás de Oliveira, P. N., Finn, C. E., Hancock, J. F., Jarret, D., Lobos, G. A., Raffle, S., & Simpson, D. (2014). Berry crops. In *Horticulture: Plants for people and places 1*, 301–325. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-94-017-8578-5_9
- Clark, J. R., Stafne, E. T. Hall, H. K. & Finn, C. E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding*, 29, 17-146. Doi: 10.1002/9780470168035.ch2
- Collada, C. (2008). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*, 9(2), 237-248.
- Darrow, G. (1952). *Rubus glaucus*. The Andean blackberry of Central and Northern South America. *Ceiba*, 3, 97-101.
- Dowrick, G. (1961). Biology of Reproduction in *Rubus*. *Nature* 191, 680–682. <https://doi.org/10.1038/191680a0>
- Edees, E. S., & Newton, A. (1988). Brambles of the British Isles. London: The Ray Society, London. 8, 323-377. <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000352582>

- Espinosa, B. N., Sánchez, L. D., García, R. A., Ariza, N. M., Ariza, N.C., & Barrero, M.L. (2009). Evaluación agronómica, nutricional y selección participativa de materiales de mora en Sylvania Cundinamarca. In *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado. Corpoica*. 34 - 42.
- Finn, C. E. (2008). Blackberries. In *Temperate fruit crop breeding* 83 –114. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-6907-9_3
- Focke, W. O. (1914). Species *Ruborum monographiae* generis *Rubi prodromus*. *Bibliotheca Botanica*, 17, 1-274.
- Franco G. y C. Giraldo. (1998). *El cultivo de la mora*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA Regional 9. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PRONATTA. 1, 130. <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/40394>
- Gale, M. D. (1994). Genetic markers, maps and wheat breeding. *J. R. Agríc. Soc. Engl.*, 155, 162- 176. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB19960081346>
- González Razo, F. J., Rebollar Rebollar, S., Hernández Martínez, J., Morales Hernández, J. L. & Abarca Ramírez, O. (2019). Situación actual y perspectivas de la producción de berries en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 44, 260-272.
- Graham, J., & R. J. McNicol, (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 1128-1132.
- Gutiérrez, V. G. (1970). Género *Rubus*. *Manual práctico de botánica taxonómica*. Medellín: Univ. Nal. de Colombia, Facultad de Ciencias Agrícolas. 1 (3), 370-378. <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/136>
- Hall, H., & Kempler, C. (2011). Raspberry Breeding. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(1), 44–62.
- Harling, G., & Anderson, L. (1996). *Rubus* L. In *Flora del Ecuador*. 56, 5-6.
- Haskell, G. (1960). The raspberry wild in Britain. *Watsonia*, 4, 238-55.
- Jennings D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. London: Academic Press. 110 p.
- Jennings, D. (1978). The blackberries of South America an unexplored reservoir of germplasm. *Fruit Varieties Journal*, 32(2), 61–63.
- Jennings, S. N. (2018). *Advances in Rubus Breeding*. In J. Graham, & R. Brennan (Eds.) *Raspberry* 1–16. Basel: Springer Cham. doi:10.1007/978-3-319-99031-6_2
- López-Gutiérrez, A. M., Marulanda Angel, M. L., Gómez-López, L. M., & Barrera-Sánchez, C. F. (2019). *Rubus glaucus* Benth.: morphology and floral biology aimed at plant breeding processes. *Revista Facultad Nacional de*

- Moore, P. P. (2008). *Rubus* spp. – red and black raspberry. In J. Janick & R. E. Paull (Eds.). *The Encyclopedia of Fruit and Nuts*. 751–757. Cambridge: CABI.
- Nuez Viñals, Fernando, and Carrillo J. M. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. *Sociedad Española de Genética; Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*. 57-64.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=1832>
- Nybom, H., Rogstad, S. H., & Schaal, B. A. (1990). Genetic variation detected by use of the M13 “DNA fingerprint” probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 79, 153-156.
- Pérez Solsona, J., & Cornejo Martín, M. J. (2014). Marcadores genéticos. In *Cómo y por qué trabajamos con células vegetales*. Valencia: Universidad de Valencia. 64, 88 – 93.
- Phillips, W., Rodríguez, H., & Fritz, P. (1995). Marcadores moleculares. In *Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo*. 33, 37-52. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE). <http://www.sidalc.net/repdoc/A4119e/A4119e.pdf>
- Pritts, M. P. (1997). Raspberries. *Journal of Small Fruit & Viticulture*, 4(3-4), 189–225. doi:10.1300/j065v04n03_02
- Rieger, R.; Michaelis, A.; Green, M. M. (1982). Diccionario de genética y citogenética: clásica y molecular. *Alhambra*. p 207.
- Romoleroux, K., 1996. Rosaceae. In G. Harling, & L. Andersson (Eds.). *Flora of Ecuador* 56, 1–152. Stockholm: Publishing House of the Swedish Research Council.
- Santos, A.M. dos, & Raseira, M. do C.B. (1988). Lançamento de cultivares de amoreira-preta. Pelotas: *EMBRAPA – CNPFT*. (EMBRAPA: Informativo 23).
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). *SICDE*. Obtenido de http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?from=20&accion=buscar&su brutina=pagina_1&column=2&busqueda=&orderBy=Notas.MedioComunicacion&order=DESC¬ald=9230209385ba3cc53c2069
- Segura, S., Rebollar-Alviter, A., Boyzo-Marín, J., Hernández-Bello, M., & López-Medina, J. (2018). Genetic resources of blackberry wild species in Michoacán, Mexico. *Acta Horticulturae*, 946, 107–111. doi:10.17660/ActaHortic.2012.946.14
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019). Obtenido de <https://www.gob.mx/senasica/articulos/berries-mexicanas-caso-de-exito>
- Shu, X., Lingdi, L. & Boufford, D. E. (2003). *Rubus*. *Flora of China*, 9, 195.285.

- Stafne, E. T., & Clark, J. R. (2004). Genetic relatedness among eastern North American blackberry cultivars based on pedigree analysis. *Euphytica*, 139, 95-104. Doi: 10.1007/s10681-004-2436-4
- Swanson, J. D., Carlson, J. E., Fernández-Fernández, F., Finn, C., Graham, J., Weber, C., & Sargent, D. (2011). Raspberries and blackberries. In K. M. Folta & C. Kole (Eds.). *Genetics, genomics and breeding of berries* 64–78. Boca Raton: CRC Press.
- Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8. <https://doi.org/10.1007/BF02680255>
- Yasmin, S, Islam, M. S., Kondoker, M., Nasiruddin, M., & Alam, S. (2006). Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Biotechnology*, 5, 27-31.

3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE CRUZAS INTERESPECÍFICAS DE *Rubus* spp. CON MARCADORES ISSR

3.1. Resumen

Las frutillas son consideradas las super frutas por su alto valor nutricional, esto ha incrementado la demanda a nivel mundial; actualmente México es el primer productor de zarzamora exportándola principalmente al mercado estadounidense. El objetivo de la presente investigación fue estudiar la diversidad genética de cruza entre la mora andina sin espinas (*R. glaucus*), la variedad 'Tupy' (*Rubus* L, Subg. *Eubatus*) y la frambuesa silvestre. De los híbridos obtenidos por las cruza controladas entre *R. glaucus* x *R. niveus*, y de *R. glaucus* x Var. Tupy, un total de 37 individuos fueron caracterizados con marcadores tipo ISSRs. Los 15 iniciadores usados produjeron un total de 130 bandas siendo el 59.14 % de loci polimórficos. A un nivel de similitud de 0.5 se formaron siete grupos de acuerdo con progenitores y al tipo de cruza. El número de loci polimórficos varió de dos (UBC 807, UBC 831) a 11 (UBC855). La heterocigosidad promedio esperada (H_e) de la población total fue 0.223, un poco menor que la obtenida en otros estudios en *Rubus* spp.; el coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) de 0.261 corresponde a una alta diferenciación genética, que puede estar asociada con el carácter de la cruza controlada de forma alógama entre especies diferentes del género *Rubus* que se evidencia en el análisis de varianza molecular donde la mayor variación estuvo dentro de los grupos (75 %) y en menor grado entre los grupos (25 %).

Palabras clave: marcadores moleculares, índice de similaridad, herencia, zarzamora, variabilidad, frutillas.

Autor: Christian Camilo Castañeda Cardona

Director de Tesis: Dr. Juan Martínez Solís

GENETIC DIVERSITY OF INTER-SPECIFIC CROSSES OF *Rubus* spp. WITH ISSR MARKERS

3.2. Abstract

Berries are considered super fruits due to their high nutritional value; this has increased the demand worldwide. Today Mexico is the first blackberry producer, mainly exported to the US market. The objective of this research was to evaluate the genetic diversity of crosses produced between the Andean berry without thorns (*R. glaucus*), the variety 'Tupy' (*Rubus* L, Subg. *Eubatus*), and wild raspberry. A total of 37 hybrids obtained by the controlled crosses between *R. glaucus* x *R. niveus*, and between *R. glaucus* x Var. Tupy, were characterized by ISSRs markers. The 15 primers produced a total of 130 bands with 59.14 % of polymorphic loci. At 0.5 similarity level seven groups were formed according to parents and type of cross. The number of polymorphic loci ranged from two (UBC 807, UBC 831) to 11 (UBC855). The expected heterozygosity average (H_e) on the total population was 0.223, a little lower compared to other studies in *Rubus* spp.; the genetic differentiation coefficient (F_{st}) reported (0.261) corresponding a high genetic differentiation, which may be associated with the trait of the alogamous controlled cross between different species of the genus *Rubus* that is evidenced in the analysis of molecular variance where the greatest variation was within the groups (75 %) than between the groups (25 %).

Key words: blackberry, molecular markers, similarity index, inheritance, variability, strawberries.

3.3. Introducción

El género *Rubus* pertenece a la familia Rosaceae que comprende alrededor de 300 especies altamente heterocigotas, distribuidas alrededor del mundo. Su nivel de ploidía va de diploides hasta dodecaploides y la mayoría son apomícticas. (Jennings, 1988). Son de relativa importancia económica donde se destacan la mora (*Rubus glaucus*) también conocida como mora andina, la zarzamora (*Rubus fruticosus*) y la frambuesa (*Rubus idaeus*) (Hao et al., 2015).

En México, estas plantas se conocen como frutillas donde se agrupan la zarzamora, fresa, frambuesa y arándanos azules. A pesar de ser nombradas como las “berries”, sus frutos son polidrupas para el caso de las moras, zarzamoras y frambuesas, en aquenio para la fresa y en baya para el arándano azul.

Las frutillas son comercializadas a nivel mundial siendo México uno de los principales productores. En el año 2020 la frambuesa aumentó en más de mil hectáreas de siembra con base al año inmediatamente anterior, ocupando un área de 8,448.6 hectáreas, con una producción de 145,349.72 t y rendimiento 18.84 t·ha⁻¹. En cuanto a las zarzamoras, para el mismo año estuvo cercano a las 10 mil hectáreas sembradas con una producción total de 215,923.73 t y rendimiento de 22.6 t·ha⁻¹ (SIAP, 2020).

El crecimiento mundial a la demanda de frutillas hizo que México aumentara el número de productores y el área de siembra que pasó de 10,684 a 36,135 hectáreas en el año 2017. El 95 % de esta superficie cultivada se concentra en cuatro estados (Michoacán, Jalisco, Baja California y Guanajuato), al igual que el 96.8 % de la producción nacional (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018). Las exportaciones ascendieron a 1,923.2 millones de dólares, siendo el destino principal Norteamérica con 96.9 %.

Este cultivo es muy reciente en el país pues en el año 2008 no hay registros oficiales de producción, una década después en el año 2018 se registra exportaciones de frutillas de 364 mil toneladas a 35 países (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria, 2019). Ubicándose a nivel mundial como tercer productor de arándano azul con 36,700 toneladas, en tercer lugar, en producción de fresa con 658,436 toneladas, mientras que la zarzamora se producen 270,399 toneladas, lo que coloca a la nación como el primer productor del mundo.

Debido a la importancia que está obteniendo este tipo de cultivo a nivel mundial por sus propiedades nutraceuticas, su aroma, color y contenidos de antioxidantes, son consideradas dentro de la categoría de alimentos funcionales, llamados super-frutas, lo que ha permitido el incremento de la demanda a nivel nacional e internacional (González et al., 2019). Por estas razones, las investigaciones centradas a las frutillas van orientada al mejoramiento de la calidad de la fruta, mayor vida de anaquel, resistencia a factores bióticos y abióticos, y mejoramiento de características deseables para el manejo agronómico.

Los marcadores moleculares son una herramienta importante en el mejoramiento asistido de especies vegetales. Estos han sido usados en especies del género *Rubus* para estudios genéticos, caracterización de poblaciones, filogenia, identificación de cultivares e híbridos, entre otros (Dotor-Robayo et al., 2016). Como por ejemplo el uso de 16 marcadores microsatélites SSR que generaron 23 locus y 26 alelos en la caracterización de *Rubus* en el departamento de Boyacá, Colombia (Moreno-Medina y Casierra-Posada, 2021). Doce marcadores RAPDs usados en mora andina y 15 *Rubus* silvestres, se agruparon según el tipo y la ubicación geográfica (Marulanda y Márquez, 2001). Esta investigación permitió a López et al. (2019) usar los marcadores SRRs y SNPs para la selección de progenitores de *R. glaucus* Benth. En Venezuela, integrantes del INIA utilizaron los RAPDs para estudios de diversidad genética de mora de los Estados de Táchira y Aragua (Roa et al., 2014).

Los marcadores ISSRs son una técnica que, tiene su importancia por ser de bajo costo, utiliza un cebador, no requiere información previa, es altamente polimórfica y diferencia especies en los taxones evaluados (Muñoz et al., 2008). Han permitido la caracterización de diversas especies vegetales como Uchuva (*Physalis peruviana*), Heliconias (*Heliconia* spp.), palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), guayaba (*Psidium guajava*), mora (*Rubus* spp.), entre otras. Por ejemplo, permitieron caracterizar la colección de mora de la Universidad Nacional de Colombia, en Palmira-Valle del Cauca (Morillo et al., 2005) al igual que la estimación de la diversidad genética de la mora en la región boyacense de Colombia (Dotor-Robayo et al., 2016) y Cancino-Escalante et al. (2011) estudiaron la diversidad genética de especies cultivadas y silvestres de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, en Norte de Santander, región Nororiental de Colombia.

En México los estudios reportados en zarzas han sido principalmente en la caracterización morfológica de colecciones y material silvestre, problemas fitosanitarios y en las propiedades fitoquímicas de frutos, no obstante, el uso de marcadores moleculares ha sido limitado. Por estas razones el presente trabajo de investigación tiene como objetivo el estudio de la diversidad genética de cruza entre la mora andina sin espinas (*R. glaucus*), la variedad Tupy (*Rubus* L, Subg. *Eubatus*) y la frambuesa silvestre (*R. niveus*) usando marcadores moleculares Inter-Secuencias Simples Repetidas o ISSRs.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Material vegetal

Se evaluaron un total de 37 individuos de *Rubus* spp correspondientes a tres parentales usados para la obtención de las cruza identificados como *R. glaucus*, *R. niveus* y la variedad Tupy; 23 individuos producto de la cruza entre *R. glaucus* y *R. niveus*; y 11 individuos procedentes de la cruza de *R. glaucus* y Var. Tupy (Cuadro 1). Los progenitores al igual que la progenie se establecieron en invernaderos del campo agrícola experimental del Departamento de Fitotecnia de

la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en la ciudad de Texcoco, Estado de México.

Cuadro 1. Progenitores y progenie de *Rubus* spp. usados en la caracterización molecular con ISSRs.

Individuo	Tipo	ID	Individuo	Tipo	ID
1	<i>R. glaucus</i>	G	20	Cruza gxn20	gn20
2	<i>R. niveus</i>	N	21	Cruza gxn21	gn21
3	Var. 'Tupy'	T	22	Cruza gxn22	gn22
4	Cruza gxn1	*gn1	23	Cruza gxn23	gn23
5	Cruza gxn2	gn2	24	Cruza gxn24	gn24
6	Cruza gxn3	gn3	25	Cruza gxn25	gn25
7	Cruza gxn4	gn4	26	Cruza gxn28	gn28
8	Cruza gxn5	gn5	27	Cruza gxt1	**gT1
9	Cruza gxn6	gn6	28	Cruza gxt2	gT2
10	Cruza gxn7	gn7	29	Cruza gxt3	gT3
11	Cruza gxn8	gn8	30	Cruza gxt4	gT4
12	Cruza gxn9	gn9	31	Cruza gxt7	gT7
13	Cruza gxn10	gn10	32	Cruza gxt8	gT8
14	Cruza gxn12	gn12	33	Cruza gxt11	gT11
15	Cruza gxn14	gn14	34	Cruza gxt19	gT19
16	Cruza gxn15	gn15	35	Cruza gxt24	gT24
17	Cruza gxn17	gn17	36	Cruza gxt25	gT25
18	Cruza gxn18	gn18	37	Cruza gxt28	gT28
19	Cruza gxn19	gn19			

*gn, Cruza entre *R. glaucus* y *R. niveus*; **gT, cruza de *R. glaucus* y var. Tupy

3.4.2. Extracción de ADN y amplificación de marcadores ISSRs

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de marcadores moleculares del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma

Chapingo, en la ciudad de Texcoco, Estado de México, a una altitud de 2258 m. Para la extracción de ADN se tomaron de 2 a 3 foliolos por planta; se pulverizaron con nitrógeno líquido y se utilizó el método de extracción del CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) y el método Dellaporta modificado por Morillo et al. (2014).

Los ADN totales se visualizaron en geles de agarosa al 1.2 % en tampón TAE 1X a 140 voltios por 30 minutos en una cámara de electroforesis horizontal Thermo Scientific OWL D3-14, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador UVP. La cuantificación se realizó con el nanodrop Thermo Scientific, 2000/ Espectrofotómetro 2000 c y se diluyó en agua tipo HPLC a un volumen de 100 μL a una concentración de 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y se almacenó a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el análisis con marcadores moleculares ISSRs se ensayaron 27 iniciadores sintetizados por Invitrogen™, los cuales se seleccionaron 15 para la caracterización molecular (Cuadro 2). Para la reacción de amplificación se preparó en un tubo de 1.5 mL una mezcla o coctel usando amortiguador a 1X, MgCl_2 3 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq polimerasa 1.5 U, iniciador 2 μM y ADN genómico 25 ng/reacción. Para un total de 25 μL de volumen final por muestra.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (AB Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial fue a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min; desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, hibridación a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cebador ACA, UBC 807, UBC 812 y UBC 831), $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cebador UBC 811, UBC 829, UBC 830, UBC 836, UBC 853, UBC 855 y UBC 856), $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cebador UBC 835), $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cebador CCA) Y $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cebador CGA Y UBC 841). El ADN amplificado fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % por 45 minutos a 140 voltios y visualizados en el transiluminador con ayuda del software VisionWorks®. Se incluyó una muestra control o blanco en cada ensayo de PCR para verificar la ausencia de contaminantes.

Cuadro 2. Iniciadores usados en la técnica de ISSRs para caracterización molecular de *Rubus* spp.

Iniciadores	Secuencia* (5'a 3')	Iniciadores	Secuencia* (5'a 3')	Iniciadores	Secuencia* (5'a 3')
ACA	BDB (ACA) ₅	UBC829	(TG) ₈ C	UBC856	(AC) ₈ YA
UBC807	(AG) ₈ T	UBC830	(TG) ₈ G	UBC835	(AG) ₈ CY
UBC812	(GA) ₈ A	UBC836	(AG) ₈ CTA	CCA	DDB(CCA) ₅
UBC831	(AT) ₈ YA	UBC853	(TC) ₈ RT	CGA	DHB(CGA) ₅
UBC811	(GA) ₈ C	UBC855	(AC) ₈ YT	UBC841	(GA) ₈ CTC

*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).

3.4.2. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se generaron con la matriz binaria de presencia (uno) y ausencia (cero). La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979). El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC) usando el método UPGMA y se generó un dendrograma con el programa TREE del paquete estadístico NTSYS. Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad insesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic Analices, versión 1.3, 1997). Se determinó el F estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95 %. Para el análisis de varianza molecular se utilizó el programa GenAEx 6.41.

3.5. Resultados y discusión

Los 15 iniciadores ISSRs generaron 130 bandas, de las cuales 78 fueron polimórficas. El número de bandas por iniciador osciló entre tres para el UBC831

y 14 para el UBC855. El mayor número de bandas polimórficas fue aportado por UBC855 con 11 bandas, seguido por los iniciadores UBC811 y UBC835 con ocho bandas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de bandas, número y porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad estimada (He), coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) de 15 iniciadores ISSR evaluados (SD de 0.095) de cruzas de *Rubus* spp.

Iniciador	Bandas totales	Loci polimórficos	Porcentaje de loci polimórficos (95 %)	He	F_{st}
ACA	5	3	60	0.1816	0.2944
CCA	6	3	50	0.2168	0.1275
CGA	8	3	37.5	0.1905	0.4811
UBC807	5	2	40	0.2293	0.3551
UBC811	11	8	72.73	0.2488	0.3928
UBC812	6	4	66.67	0.1448	0.5868
UBC829	8	6	75	0.2111	0.2089
UBC830	9	5	55.56	0.2014	0.2926
UBC831	3	2	66.67	0.358	0.1055
UBC835	11	8	72.73	0.2494	0.1737
UBC836	12	7	58.33	0.2814	0.1741
UBC841	13	6	46.15	0.1869	0.3263
UBC853	12	6	50	0.13	0.0861
UBC855	14	11	78.57	0.222	0.1653
UBC856	7	4	57.14	0.291	0.1435
Total	130	78	59.14	0.223	0.261

Heterocigosidad estimada (He), coeficiente de diferenciación genética (F_{st}).

Estudios realizados en mora en Colombia con la misma técnica de marcadores ISSRs o también conocidos como RAMs (Ramdon Amplific Microsatellite), han obtenido valores similares con una He de 0.29 y F_{st} de 0.29 en poblaciones de mora andina en el departamento de Boyacá (Dotor-Robayo et al., 2016) y la He de 0.31 y el F_{st} de 0.60 en la colección de mora de la Universidad Nacional de

Colombia sede Palmira, Valle del Cauca (Morillo et al., 2005). Otras técnicas usadas en investigaciones en frutillas como los SSRs fueron usados para estimar el polimorfismo de la ruta de flavonoides en fresa (*Fragaria* sp.) y en zarzamoras (*Rubus* sp.), dan resultados más elevados de He (0.51) usando 25 iniciadores (Lebedev et al., 2020); lo mismo sucede en el estudio con estos marcadores para la selección de progenitores en *R. glaucus* Benth. usando 22 iniciadores de los cuales 15 fueron los que mejor sirvieron con 29 loci y 58 alelos, con una He de 0.60 (López et al., 2019). Esta diferencia en los valores obtenidos puede deberse a la naturaleza del marcador usado, pues los SSRs son marcadores codominantes que permiten diferenciar organismos homocigotos de los heterocigotos aumentando la heterocigosidad estimada en las poblaciones de estudio.

La heterocigosidad estimada (He) estuvo comprendida entre 0.13 y 0.358 para los iniciadores UBC853 y UBC831, respectivamente, donde el promedio general fue de 0.223 para la población total. Estos resultados demuestran que existe una moderada diversidad genética, la cual posiblemente se deba a que los individuos analizados están emparentados, ya que son hermanos completos y medios hermanos. También puede deberse al flujo genético que existe entre plantas de *Rubus* y el intercambio de material vegetal entre los agricultores y las formas de propagación de los cultivares. De igual forma se puede explicar el moderado porcentaje de loci polimórficos con un total de 59.14 %, siendo el iniciador UBC855 el que aportó mayor porcentaje de polimorfismo en sus loci con 78.57 % equivalente a 11 bandas, seguido de los iniciadores UBC811 y UBC835 con 72.73 % equivalente a 8 bandas polimórficas (Cuadro 3). Estos iniciadores podrían ser considerados de importancia para encontrar polimorfismo en especies relacionadas al género *Rubus*, así como las cruzas que puedan darse entre ellas para programas de mejoramiento genético y caracterización molecular.

El coeficiente de Nei y Li (1979) mostró un nivel de similitud de 0.5 que diferenció a los individuos evaluados en siete grupos. En un primer grupo se ubicaron la

mayoría de los genotipos producto de la cruce entre *R. glaucus* y *R. niveus* (identificados con las letras gn) y a un coeficiente de 0.70 se encontró al progenitor *R. glaucus*, esto puede deberse a la presencia de bandas maternas en los genotipos de la F₁ como consecuencia de la heredabilidad de caracteres genéticos encontrados con la técnica de ISSRs (Figura 1).

Un segundo grupo formado por los dos progenitores machos (*R. niveus* y var. Tupy) que se aleja un poco más que el progenitor hembra de la población (GXN) a un coeficiente de 0.58. A pesar de que ambos son especies diferentes, parten desde el mismo punto lo cual puede deberse a que pertenecen al mismo género y comparten un acervo genético cercano por lo que es posible el cruzamiento entre especies de zarzas con frambuesas (Jennings, 1978) como fue en este estudio, pues la *Rubus niveus* perteneciente al subgénero *Idaeobatus* donde se encuentran las frambuesas (*R. idaeus*), sus drupeolas no están unidas al receptáculo floral, una característica importante en ellas a diferencia de la *R. glaucus* que permanecen unidas al receptáculo.

La variedad Tupy pertenece al género *Rubus* y al subgénero *Eubatus*. Proviene de la cruce entre un cultivar uruguayo y el cultivar comanche (Moore et al., 1974; Raseira et al., 1984). El cultivar Uruguai era un clon cuya identidad no es conocida y el cultivar Comanche procede de Estados Unidos de América (EE. UU.) originado en la Universidad de Arkansas producto de la cruce entre 'Brazos' x 'Darrow' en 1974. El cultivar Brazos es un híbrido obtenido por Universidad de Texas en 1959, siendo esa región unas de las pioneras en el siglo XIX en realizar mejoramiento genético en frutillas especialmente zarzamoras y frambuesas haciendo cruces entre ellas y entre plantas silvestres (Antunes, 2002).

Los grupos tres y cuatro formados se encuentran las plantas de la F₁ de la cruce de *R. glaucus* x var. Tupy, se separan a un coeficiente de 0.46 con un total de diez individuos de los 11 en total. Sólo el genotipo gT28 (grupo cinco) fue el que se apartó del resto del conglomerado (GXT) a una distancia de 0.34 esto se debe al número reducido de bandas amplificadas con los 15 iniciadores usados en la caracterización, al igual que sucedió en el grupo seis y grupo siete con los

genotipos gn (3, 4, 5, 6 y 7) por lo que se considera realizar ensayos con otros iniciadores ISSRs que permitan la amplificación del ADN. También puede deberse a diferencias morfológicas que relacione las bandas no amplificadas con alguna o algunas características morfológicas que estén presentes o ausentes en dicha progenie.

El coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) para el total de la población estudiada con los 15 cebadores ISSRs es de 0.261 con una desviación estándar de 0.095, lo cual muestra según Wright (1978), valores mayores de 0.25 una alta diferenciación genética, lo cual probablemente se deba al bajo flujo genético entre los genotipos evaluados y el nivel de estructuración presente en la población. Cabe anotar que entre especies diferentes del género *Rubus* que, aunque la naturaleza de la mora andina, la variedad Tupy y la *R. niveus* es de carácter autógena son compatibles entre sí, que por su cercanía genética pueden cruzarse, pero siempre y cuando sea la planta madre o planta receptora de polen la *R. glaucus*. Aunque se desconocen las causas, las cruza recíprocas en este estudio no tuvieron éxito. A pesar de que, la forma de propagación de las zarzas principalmente es de forma asexual por acodo, esqueje o estaca, aún conservan variabilidad genética la cual debe ser preservada e incorporarse en programas de mejoramiento genético.

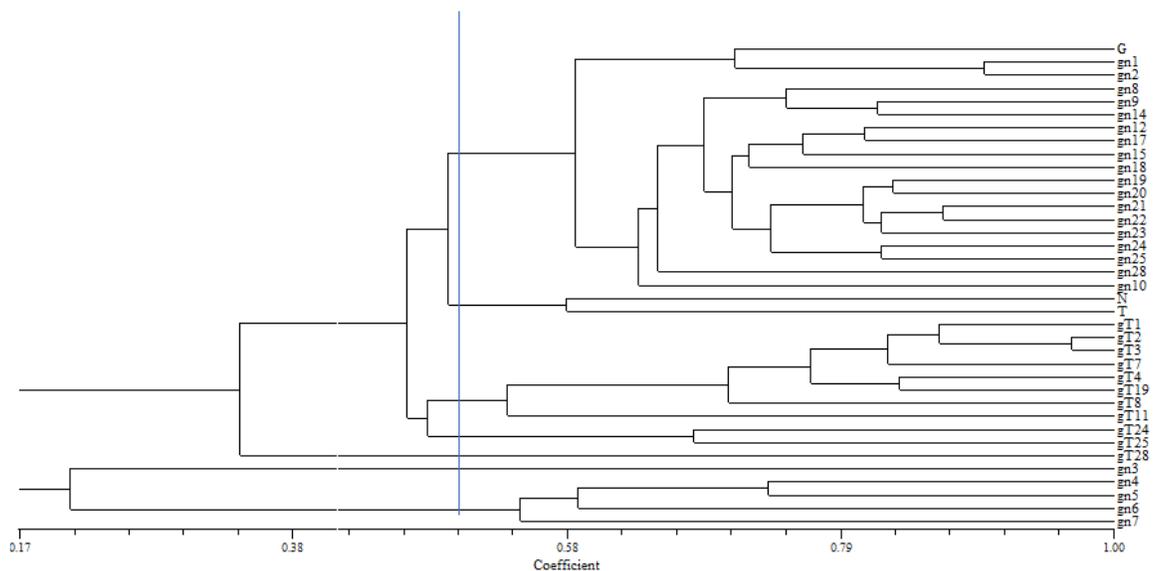


Figura 1. Dendrograma de la estructura genética de 37 individuos de *Rubus* spp. basado en el coeficiente de Nei –Li y calculado de los datos combinados de 15 marcadores ISSR. *G, *R. glaucus*; *N, *R. niveus*; *T, variedad Tupy; *gn, (*R. glaucus* x *R. niveus*); *gT (*R. glaucus* x Var. Tupy).

Al analizar las dos cruzas y los parentales con el método de UPGMA se formaron tres grupos relacionados donde los parentales (grupo uno) se alejan de los grupos dos y tres que parten del mismo punto (Figura 2). Debiéndose a que la distancia genética entre padres e hijos es mayor a la diferencia encontrada entre las progenies resultantes de las cruzas entre *R. glaucus* x *R. niveus* y *R. glaucus* x variedad Tupy que comparte a uno de los progenitores como lo es la mora andina sin espinas, siendo esta la planta madre y sus descendientes hermanos completos y medios hermanos, respectivamente, entre el grupo dos con el grupo tres.

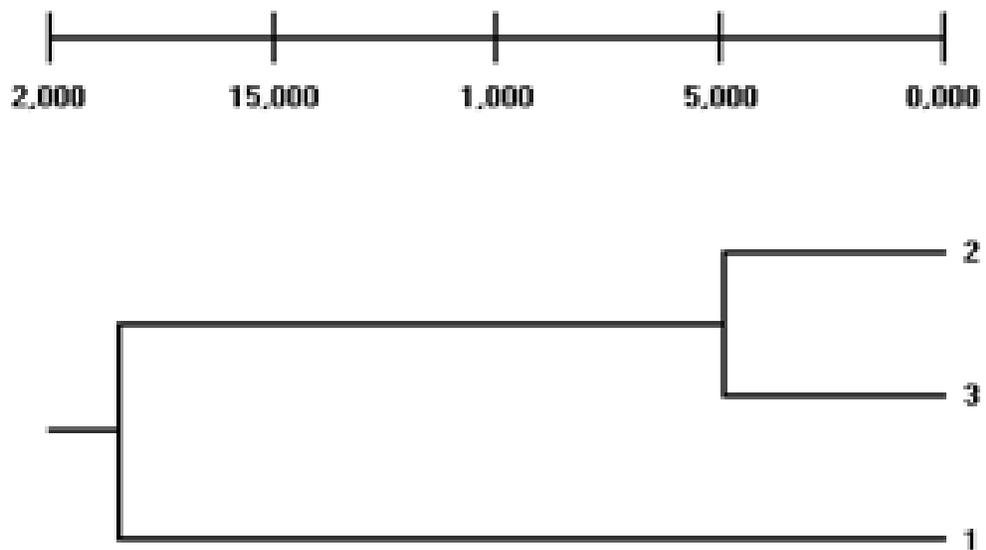


Figura 2. Dendrograma obtenido con el método UPGMA usando el programa TFPGA para los tres grupos evaluados. Grupo 1) progenitores. Grupo 2) plantas procedentes de la crucea *Rubus glaucus* x *R. niveus* Grupo 3) Plantas procedentes de la crucea *R. glaucus* x Var. Tupy.

En el análisis de varianza molecular mostró que el 75 % de la variación observada corresponde a la encontrada en los individuos dentro del mismo grupo por lo que se considera que la mayor diferencia es entre plantas dentro de cada

conglomerado formado por cruza y por parentales y que dentro de estas aún hay diferenciación como se observa en la Figura 1 y el distanciamiento entre ellas a diferentes coeficientes de similaridad y 25 % la diferenciación entre grupos por lo que se debe aprovechar para continuar con estudios de caracterización morfológica en estructuras reproductivas y en planes de mejoramiento genético (Cuadro 4). Resultados similares fueron obtenidos por Dotor-Robayo et al. (2016) en la caracterización de *R. glaucus* en Boyacá con valores de 77 % entre individuos y 23 % entre grupos. Los mismos resultados fueron reportados por Moreno-Medina y Casierra-Posada (2021) usando marcadores SSR en 13 materiales entre silvestres y cultivados del género *Rubus* sp. Es posible que ese comportamiento frecuente en la caracterización molecular de este género se deba a la estrecha relación entre cultivares y silvestres que aumentan la diversidad dentro de los grupos.

Cuadro 4. Análisis de varianza molecular entre y dentro de los grupos de cruza de *Rubus* spp. utilizando 15 marcadores ISSRs. ($P \leq 0.001$).

Fuente de variación	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Componentes de variación	Variación
Entre grupos	2	128,828	64,414	5,143	25 %
Dentro grupos	34	512,469	15,073	15,073	75 %
Total	36	641,297		20,215	100 %

Gl: grados de libertad.

3.6. Conclusiones

La caracterización molecular permitió el agrupamiento de las poblaciones estudiadas según el tipo de cruza o progenitor.

Las principales diferencias genéticas se dan en la diversidad que existe en cada población de la F₁ de cruza entre especies distintas pero muy cercanas genéticamente, puesto que los cultivares modernos de zarzamora no distan de muchas generaciones de progenitores silvestres usados para el mejoramiento genético.

El uso de marcadores moleculares permite la aproximación de la diversidad genética a temprana edad, comprendiendo el parentesco entre ellas. La implementación de los marcadores ISSR arrojó una alta diferenciación genética por el cruzamiento entre especies diferentes pero pertenecientes al mismo género que permite ampliar la base genética para responder a nuevos desafíos fitosanitarios, ambientales y en la obtención de plantas con características deseables como la ausencia de espinas principalmente para facilitar las labores culturales en cultivos de zarzamoras. Siendo útiles para futuros programas de fitomejoramiento que incluyan la variabilidad genética, las características morfológicas vegetativas y de frutos como la identificación molecular de nuevos cultivares.

3.7. Literatura citada

- Antunes, L. E. C (2002). Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 32(1),151-158. doi.org/10.1590/S0103-84782002000100026
- Cancino-Escalante, G. O., Sánchez-Montaña, L. R., 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. doi: 10.11144/Javeriana.SC16-3.pcor
- Dotor-Robayo, M. Y., González-Mendoza, L. A., Castro, M. A., Morillo-Coronado, A. C., & 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), 10-17. doi.org/10.18684/BSAA(14)10-17
- González Razo, F. Rebollar Rebollar, S. Hernández Martínez, J. Morales Hernández, J & Abarca Ramírez, O. (2019). Situación actual y perspectivas de la producción de berries en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 44, 260-272.
- Hao, D. A., Gu, X. J., & Xiao, P.G. (2015). *Potentilla* and *Rubus* medicinal plants: potential non-Camellia tea resources. In *Medicinal Plants, Chemistry, Biology and Omics*. 373-430.
- Jennings, D. L. (1978) The blackberries of South America—an unexplored reservoir of germplasm. *Fruit Varieties Journal*, 32(2), 61-63. <https://www.cabi.org/isc/abstract/19901610038>
- Jennings D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. London: Academic Press. 110 p.

- Lebedev, V. G., Subbotina, N., Maluchenko, O., Levedeva, T., Krutovsky, K., & Shestibratov, K. (2020). Transferability and polymorphism of SSR markers located in flavonoid pathway genes in *Fragaria* and *Rubus* species. *Genes*, 11(1), 11-35. doi:10.3390/genes11010011
- López, A., Barrera, C., & Marulanda, M. (2019). Evaluation of SSR and SNP markers in *Rubus glaucus* Benth progenitors selection. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(1), e-081. doi.org/10.1590/0100-29452019081
- Marulanda, M., & Márquez, M. (2001). Caracterización de la diversidad genética de *Rubus glaucus* benth con marcadores moleculares RAPD. *Actualidades Biológicas*, 23(74), 57-63. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/329619>
- Moore, J. N., Brown, E., & Sistrunk, W. A. (1974). 'Comanche' blackberry. *HortScience*, 9(3), 245-246.
- Moreno–Medina, B., & Casierra–Posada, F. (2021). Molecular characterization of a species in the genus *Rubus* in Boyacá, Colombia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 43(2), e-713. <https://doi.org/10.1590/0100-29452021713>.
- Morillo, A., Morillo, Y., & Pinzón, E. (2014). Caracterización con RAMs de la colección de durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch existente en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 367-376. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)10-17](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)10-17).
- Morillo, A., Morillo, Y., Muñoz, J., Vásquez, H., & 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 Agronómica*, 54(2) 15-24.
- Munoz Florez, J. E., Morillo Coronado, A. C., & Morillo Coronado, Y. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 219-226. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012028122008000400001
- Nei, M., y Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *Proceedings of the National Academic of Sciences of United states of America*, 79, 5267-5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Raseira, M. do C.B., Santos, A. M. Dos, & Madail, J. C. M. (1984). *Amora preta: cultivo e utilização* (Circular Técnica 11, 20 p.). Pelotas: EMBRAPA-CNPFT.
- Roa, S., Fernández, H., Castro, L., & Useche, N. (2014). Diversidad genética de especies de *Rubus* determinada mediante RAPD. *Agronomía Tropical*, 64(3-4), 227-235. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002192X2014000200009

- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). *SICDE*. Obtenido de http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?from=20&accion=buscar&subrutina=pagina_1&column=2&busqueda=&orderBy=Notas.MedioComunicacion&order=DESC¬ald=9230209385ba3cc53c2069
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019). Obtenido de <https://www.gob.mx/senasica/articulos/berries-mexicanas-caso-de-exito>.
- SIAP. (2020). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. URL: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations* (Vol. 4). Chicago: Chicago University Press.

4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CRUZAS INTERESPECÍFICAS DE *Rubus* spp.

4.1. Resumen

Las frutillas como la zarzamora y la frambuesa han tenido una importante relevancia en los últimos años por su calidad nutraceútica, la rentabilidad del cultivo, su rápido retorno y mayor requerimiento de mano de obra. El objetivo de esta investigación fue realizar la caracterización morfológica de híbridos producto de cruza controladas entre *R. glaucus* Beth (mora de castilla o mora andina), *R. niveus* (frambuesa), la variedad Tupy y los progenitores. En un total de 59 plantas se evaluaron 13 variables cualitativas y 10 cuantitativas; se usaron métodos estadísticos multivariados como análisis de componentes principales, se realizó agregación jerárquica de conglomerados y de correlación. Se determinaron análisis descriptivos como de tendencia central y dispersión para los datos cuantitativos, mientras que para datos cualitativos se calcularon las frecuencias. En términos de rasgos morfológicos, el quinto componente explicó el 79.76 % de la variabilidad total. Se formaron cinco conglomerados de similitud, en los que la presencia o ausencia de espinas fue la característica de mayor contribución para su conformación.

Palabras claves: Variabilidad, descriptor, zarzamora, similaridad, fenotipo.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INTERSPECIFIC CROSSES OF *Rubus* spp.

4.2. Abstract

Berries such as blackberry and raspberry have had an important relevance in recent years due to their nutraceutical quality, crop profitability, rapid return, and higher labor requirement. The objective of this research was to determine the morphological characterization of resulting hybrids of controlled crosses between *R. glaucus* Beth (blackberry of castile or Andean blackberry), *R. niveus* (raspberry), Tupy variety, and the parents. In a total of 59 plants were evaluated 13 qualitative and 10 quantitative variables. Multivariate statistical methods were used such as principal component analysis, hierarchical aggregation of clusters and correlation. Descriptive analyzes such as central tendency and dispersion were determined for quantitative data, while frequencies were calculated for qualitative data. In terms of morphological traits, the fifth component explained 79.76 % of the total variability. Five similarity clusters were formed, in which the presence or absence of thorns was the trait with the greatest contribution for its conformation.

Keywords: Variability, descriptor, blackberry, similarity, phenotype.

4.3. Introducción

El género *Rubus* con alrededor de 300 especies altamente heterocigotas, caracterizado por su variabilidad morfológica (Espinosa et al., 2016), distribuidas alrededor del mundo. Incluye especies leñosas, arbustivas, herbáceas, trepadores y postradas, con láminas foliares simples o compuestas (Clark et al., 2007). Su nivel de ploidía va de diploides hasta dodecaploides y la mayoría son apomícticas (Jennings, 1988). Son de relativa importancia económica donde se destacan la mora (*Rubus glaucus*) también conocida como mora andina, la zarzamora (*Rubus fruticosus*) y la frambuesa (*Rubus idaeus*) (Hao et al., 2015).

Desde México y hasta el Ecuador se extienden diferentes especies de zarzamoras entre los 2000 y 3100 msnm (Cancino-Escalante et al., 2011). Solo en México, dada la geografía mexicana se han reportado alrededor de 50 a 61 especies (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005; GBIF Secretariat, 2017). Muchas de estas han sido objeto de estudio para la caracterización morfológica como un primer paso para conocer los materiales existentes y la importancia que tienen para la conservación e implementarlas en programas de mejoramiento genético.

Estudios realizados para la caracterización morfológica de especies de *Rubus* spp. en Ecuador, se efectuaron para identificar genotipos élites que permitan mejorar la productividad y calidad de la fruta, pues las condiciones de los pequeños y medianos productores de moras en las regiones altas de los Andes no les ha permitido mejorar sus ingresos y ser competitivos en el mercado nacional e internacional (Sánchez-Morales et al., 2018). En Brasil, la importancia de conocer la diversidad fenotípica y la calidad de la fruta se centra en las oportunidades de negocio existente a nivel nacional, pues la demanda es mayor que la oferta por lo que se han visto en la necesidad de importar frutillas (Antunes, 2002).

En México existen estudios de caracterización morfológica de especies silvestres y cultivadas evaluando factores climáticos (Rodríguez-Bautista et al., 2018). Con el fin de determinar la variabilidad fenotípica que les permita identificar los mejores cultivares para la producción en diferentes zonas agroecológicas. El objetivo de la presente investigación fue la caracterización morfológica de tres progenitores de *Rubus* spp. y los híbridos resultantes de los diferentes cruzamientos mediante descriptores morfológicos vegetativos cualitativos y cuantitativos.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Obtención de semilla

Se colectó polen de flores en estado de palomita de las especies *R. glaucus*, *R. niveus*, y var. Tupy; para ello se extrajeron las anteras colocándolas en papel aluminio bajo luz led por 24 horas para su apertura. Luego se almacenaron en un tubo Eppendorf para ser guardadas en refrigerador a 4 °C para su conservación.

Para las cruza directas y sus recíprocas, las flores a polinizar se emascularon antes de la anthesis en estado de palomita y luego con un pincel se aplicó el polen en los estigmas de la flor. Posteriormente, se cubrieron flores con papel aluminio y otras con bolsas herméticas; se etiquetaron con la fecha las plantas polinizadas y también se usaron listones de colores para identificar el tipo de cruza.

Al madurar el fruto, las semillas se colectaron y se fermentaron por tres días; se retiró el mucílago y las semillas se secaron en hojas de papel por 24 horas a la sombra a una temperatura promedio de 22 °C.

4.4.2. Germinación

La germinación de semillas se llevó a cabo a una temperatura que osciló entre los 18 y 24 °C bajo condiciones de invernadero; para tal efecto, las muestras se remojaron previamente en una solución de Cloralex® (solución de hipoclorito de sodio al 5.25 %) durante 24 horas. La siembra se hizo en charolas de germinación de 54 x 27 cm y de 210 cavidades de 15 mL cada una en los que se utilizó una

mezcla de agrolita y “peat moss” con relación 1:1; posteriormente las plántulas fueron trasplantadas a bolsas de vivero negra de 15 x 34 cm con suelo y la mezcla de “peat moss” y agrolita a una relación 4:1.

4.4.3. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se llevó a cabo en plantas de 6 a 12 meses de establecidas en Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado a 19°29'23” de latitud norte y 98°53'37” de longitud oeste a una altitud de 2258 m. El clima de la región es templado subhúmedo con un porcentaje de precipitación invernal inferior a 5 %, con poca oscilación térmica y marcha de la temperatura tipo Ganges (García, 2005).

De cada planta evaluada se obtuvieron tres datos por cada descriptor morfológico vegetativo (Cuadro 5), 13 atributos cualitativos y 10 atributos cuantitativos, registrados entre la sexta y séptima yema del tallo principal (Córdoba y Londoño, 1996). La medición de los rasgos morfológicos se tomó en campo entre marzo y julio de 2021. Los descriptores cuantitativos evaluados se midieron con un flexómetro graduado Truper® FC-3M y un calibrador vernier digital Steren® HER-411; además, las variables cualitativas se hicieron con base a la calificación, puntuación y codificación indicada en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Descriptores morfológicos vegetativos para la F₁ de cruzas de *Rubus glaucus* x *R. niveus*; *R. glaucus* x var. Tupy y los respectivos progenitores.

Descriptor Cualitativo	Clave	Descriptor Cuantitativo	Clave
1. Cerosidad del tallo (presencia-ausencia)	C_T	14. Diámetro del tallo (mm)	D-T (mm)
2. Forma del tallo (circular, acanalado)	For_T	15. Número de espinas en entrenudos 7 u 8.	N° Es_T(4)
3. Espinas en el tallo (presencia-ausencia)	Es_T	16. Número total de tallos principales	N° T_P
4. Pubescencia de la hoja nervadura principal (presencia-ausencia)	Pub_H	17. Longitud (cm) del tallo	T (cm)

5. Forma de las espinas del tallo (rudimento, curvados hacia abajo o ambos)	For_EsT	18. Longitud (cm) del foliolo terminal	Lon_Ft
6. Base de la espina en el tallo (angosta-amplia)	Ba_EsT	19. Longitud de entrenudo (entrenudo 7 u 8) (cm)	Lon_EN
7. Pigmentación antociánica del tallo	Pig_T	20. Longitud (cm) del ancho del foliolo terminal	An_Ft
8. Forma de la hoja (número de foliolos) (tri, penta o heptafoliada)	For_H	21. Longitud del peciolo (cm)	Lon_Pec
9. Margen de la hoja (biserrado, serrado)	Marg_H	22. Longitud del peciolulo terminal (cm)	Lon_Pect
10. Forma de la base de la hoja (sucordada-subtruncada, o ambas, obtusa)	For_BaH	23. Longitud de las espinas del tallo (mm)	Lon_Es
11. Forma del ápice de la hoja (acuminado, agudo)	For_ApH		
12. Forma del foliolo terminal (ovado, elíptico, rómbico)	For_FoT		
13. Color del envés (blanco (1) o verde (0))	Col_Envés		

4.4.4. Análisis estadístico

Para los descriptores morfológicos se evaluaron los parámetros: media, valor mínimo, valor máximo, desviación estándar y coeficiente de variación. Los coeficientes de variación se determinaron como indicadores de variabilidad. Los datos de las accesiones fueron analizados mediante un análisis de componentes principales utilizando el programa estadístico JMP® (Sall et al., 2017). Los valores medios de cada descriptor se utilizaron para crear una matriz de correlación a partir de la cual se extrajeron las puntuaciones de los componentes principales estandarizados.

Los descriptores multiestado se clasificaron según la escala de presencia (1) o ausencia (0) (Sneath y Sokal, 1973; Crisci y López, 1983). Para la clasificación de los análisis de las características morfológicas se realizó usando el coeficiente

de Dice obteniendo un dendrograma agrupando los genotipos según sus diferencias y similitudes.

Debido a las diferencias de escala, para evitar sus efectos, se utilizaron los valores de Z para estandarizar la media de cada descriptor. Los análisis de componentes principales se usaron para conocer los patrones de variabilidad de los descriptores morfológicos vegetativos cuantitativos dentro de la población de híbridos y progenitores de *Rubus* spp., al igual que la correlación que pueda existir entre las mediciones

Para ejecutar un análisis de agrupamiento y analizar la variación entre las accesiones, las matrices de distancia fueron generadas a partir de los datos de entrada morfológicos cuantitativos. Los coeficientes de distancia morfológica se calcularon según el método de Euclides usando el programa SIMINT y los dendrogramas se construyeron a través del programa de agrupamiento de SAHN usando el método de grupo de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA) de NTSYS-pc versión 2.10 (Rohlf, 1994).

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Caracteres morfológicos cualitativos

Se evaluaron 13 variables cualitativas en tres parentales identificados como *R. glaucus*, *R. niveus* y var. Tupy y 56 híbridos correspondientes a 28 resultantes del cruzamiento entre *R. glaucus* x *R. niveus* y 28 del cruzamiento entre *R. glaucus* x 'Tupy'. Se observó una alta variación en la presencia de espinas tanto de los padres como en híbridos, cuya presencia se acercó al 50 % de la F₁ en ambas cruas (Figuras 3 y 4).



Figuras 3 y 4. Ausencia y presencia de espinas en los híbridos de cruza interespecíficas de *Rubus* spp.

La variable presencia de espinas permitió diferenciar genotipos en dos subgrupos de la misma cruce, en una proporción de 57.2 % sin espinas y del 42.8 % con espinas para los híbridos resultantes de la cruce *R. glaucus* x *R. niveus*. En los híbridos provenientes de la cruce *R. glaucus* x var. Tupy, se encontraron proporciones similares, con valores de 46.43 % sin espinas y de 53.57 % con espinas. Estudios similares han sido reportados por Espinosa et al. (2016) quienes agruparon *R. glaucus* sin espinas por un lado y por otro, varias accesiones de especies del mismo género, donde además el resto de las variables no fueron significativas.

4.5.2. Estadísticos descriptivos de los caracteres morfológicos cuantitativos

El valor del coeficiente de variación (CV) puede indicar la capacidad de diferenciar entre genotipos basándose en los rasgos morfológicos de las accesiones. Aquellos descriptores que tengan un CV valor por debajo del 20 % indicó poca variación y baja contribución para la discriminación; como lo fueron las variables diámetro de tallo (D_T) y ancho del foliolo terminal (An_Ft). En

cambio, ocho de las diez características medidas, es decir 80 % de los descriptores en los 59 materiales entre híbridos de cada cruce y los padres, mostraron CV mayores al 20 % lo que indicó grandes diferencias morfológicas entre ellos (Cuadro 6) por lo que pueden ser marcadores confiables para diferenciar genotipos siendo más discriminatorios (Khadivi-Khub, 2014).

El mayor CV (129 %) se observó en el número de espinas en los entrenudos (N_esp), seguidos de la longitud de tallo (Lon_T) y longitud de espinas (Lon_es). El ancho del foliolo terminal (An_Ft) y el diámetro de tallo (D_T) presentaron los menores promedios fluctuando entre 20 y 14 %, respectivamente.

Cuadro 6. Valores mínimos (Min), máximos (Máx), medios, desviaciones estándar (SD) y coeficientes de variación (CV %) de los rasgos morfológicos de las variables cuantitativas evaluadas en genotipos de *Rubus* spp.

Variable	Media	SD	Min	Máx	CV (%)
D_T1	4.25	0.86	2.07	7.70	20.3
D_T2	4.84	0.8335	3.50	8.63	17.2
D_T3	5.44	0.78	4.04	8.40	14.465
N_esp4	5.38	7.00	0	23.00	129.87
N_esp5	5.22	6.59	0	20.00	126.32
N_esp6	4.67	6.04	0	18.00	129.11
N_T	2.10	0.99	1.00	4.00	47.32
L_T1	40.48	50.61	7.00	331.00	125.02
L_T2	65.29	50.25	14.00	331.00	76.96
L_T3	86.46	46.93	25.50	331.00	54.27
L_Ft6	5.55	2.48	2.38	9.80	44.85
L_Ft7	5.92	2.78	2.14	10.60	47.06
L_Ft8	5.93	2.73	2.20	10.80	46.05
L_EN1	12.00	5.07	5.10	30.75	42.25
L_EN2	12.91	5.10	5.00	23.61	39.05
L_EN3	14.20	7.00	4.80	34.27	49.29
An_Ft1	5.39	0.83	3.50	8.60	15.39
An_Ft2	5.55	0.98	3.00	8.40	17.65
An_Ft3	5.50	0.97	3.20	7.40	17.47

Lon_Pec1	7.20	1.53	3.30	13.00	21.34
Lon_Pec2	8.28	6.08	3.10	53.00	73.46
Lon_Pec3	7.61	1.20	3.40	10.20	15.74
Lon_Pec_t1	2.67	0.77	1.20	4.20	29.1
Lon_Pec_t2	2.91	0.84	0.90	4.30	29.08
Lon_Pec_t3	2.92	0.87	0.60	5.20	30.08
Lon_Es1	1.95	2.15	0	7.40	110.14
Lon_Es2	2.10	2.21	0	6.00	105.23
Lon_Es3	2.12	2.27	0	7.50	107.07

Solanas et al. (2005) indicaron que no es recomendable valores de CV por encima de 100, pues demuestra una dispersión alta en los datos. Esto se presentó en los descriptores como número de espinas (N_esp) y longitud de las espinas (Lon_esp) puesto que uno de los parentales (*R. glaucus*) y algunos híbridos no presentaron espinas, por lo que el valor fue igual a cero en algunos materiales y en ambos descriptores lo que ocasionó valores extremos. Algo similar sucedió con la longitud del tallo (Lon_T) en su etapa inicial arrojando valores en algunos materiales muy bajos comparados con otros y con sus padres. En estos casos, la variabilidad fue debida a la naturaleza de los progenitores y a los caracteres heredados por la F₁ en ambas cruzas y se descarta que pueda existir algún tipo de error o sesgo en la toma de los datos que diera lugar a una dispersión tan elevada.

4.5.3. Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales para las variables cuantitativas de tipo vegetativa, mostró que el 79.75 % de la variación total fue explicada por cinco componentes (Cuadro 7). En estos componentes el grupo de variables que se destacan son: Longitud del foliolo terminal, longitud del peciolulo terminal, así como algunas medidas de estructuras del tallo como longitud y diámetro, y longitud de espinas del tallo.

El primer componente principal constituye el 30.628 % de la varianza total explicada, de acuerdo con los datos de correlación las variables que contribuyeron de manera positiva con este componente fue la longitud del foliolo terminal (Lon_Ft7) y longitud del entrenudo (Lon_es3). Por otra parte, la variable número de tallos principales (N_T) fueron las que contribuyeron de forma negativa. Lo anterior indica que en el primer componente agrupa los híbridos con foliolos terminales y entrenudos largos y menor número de tallos principales por planta (Cuadro 8).

Cuadro 7. Valores propios y proporción de la varianza explicada por análisis de componentes principales de progenitores y cruzas de *Rubus* spp.

Comp.	Valor propio	Varianza (%)		Comp.	Valor propio	Varianza (%)	
		(%)	Acumulada			(%)	Acumulada
1	8.5757	30.628	30.628	7	0.8441	3.015	86.757
2	5.8159	20.771	51.399	8	0.7785	2.780	89.538
3	3.9438	14.085	65.484	9	0.5571	1.990	91.527
4	2.1556	7.698	73.182	10	0.4690	1.675	93.202
5	1.8414	6.576	79.759	11	0.3032	1.083	94.285
6	1.1154	3.984	83.742	12	0.2818	1.006	95.292

El segundo componente principal contribuyó con alrededor del 21 % de la varianza total (Cuadro 8) de acuerdo con los coeficientes del segundo vector propio, las variables que más contribuyeron fueron longitud de espinas (Lon_es3) con 0.4195 y número de espinas 5 (N_Esp5) con 0.4125.

Con base a los resultados de Zamorano et al. (2007), las variables que más aportaron a los componentes principales fueron similares a las obtenidas en este estudio, debido a que longitud del peciolulo, longitud del peciolo y ancho del foliolo destacaron en la variabilidad de la colección de mora de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Al igual que Espinosa et al. (2016), los descriptores que más aportaron en la discriminación de las accesiones de la colección de *Rubus* de variedades nativas de los Andes colombianos fueron las

que tienen relación con mediciones en hoja como longitud del peciolo en rama vegetativa y reproductiva, longitud del peciolo en rama vegetativa, longitud del foliolo, y número de aguijones en hoja.

Cuadro 8. Vectores propios de los primeros cinco componentes principales en la caracterización morfológica de genotipos de progenitores y cruzas de *Rubus* spp.

C	Variables	Valor del Coeficiente	C	Variables	Valor del Coeficiente
1	Número de tallos principales (N_T)	-0.307641	3	Diámetro de tallo (D_T1)	0.4045591
	Longitud foliolo terminal (L-Ft6)	0.4127813		Diámetro de tallo (D_T2)	0.4466572
	Longitud foliolo terminal (L-Ft7)	0.4175371		Diámetro de tallo (D_T3)	0.4187982
	Longitud foliolo terminal (L-Ft8)	0.3977437		Ancho del foliolo terminal (An_Ft1)	0.4243987
	Longitud del entrenudo (L_N1)	0.3139093		Ancho del foliolo terminal (An_Ft2)	0.3844025
	Longitud del entrenudo (L_N2)	0.383692		Ancho del foliolo terminal (An_Ft3)	0.3654556
	Longitud del entrenudo (L_N3)	0.3958189		Longitud del tallo (L-T1)	0.5738228
	Número de espinas (N_Esp4)	0.4052756		Longitud del tallo (L-T2)	0.5831148
2	Número de espinas (N_Esp5)	0.4125456	4	Longitud del tallo (L-T3)	0.5750692
	Número de espinas (N_Esp6)	0.4073963		Longitud del peciolo (Lon_Pec1)	0.4318986
	Longitud de espina (Lon_es1)	0.3936639		Longitud del peciolo (Lon_Pec3)	0.4007704
	Longitud de espina (Lon_es2)	0.4105814	5	Longitud del Peciolo terminal (Lon_Pec_t1)	0.453112
	Longitud de espina (Lon_es3)	0.4195685		Longitud del Peciolo terminal (Lon_Pec_t2)	0.4800406
				Longitud del Peciolo terminal (Lon_Pec_t3)	0.465937

C: Componente.

En cuanto al análisis de correlaciones se observó que el número de espinas (N_esp) en el tallo y el número de tallos (N_T) están relacionadas en forma negativa, por lo que ambos vectores son opuestos, esto indica que al tener mayor número de espinas en el tallo hay menor cantidad de tallos principales en la planta (Figura 5).

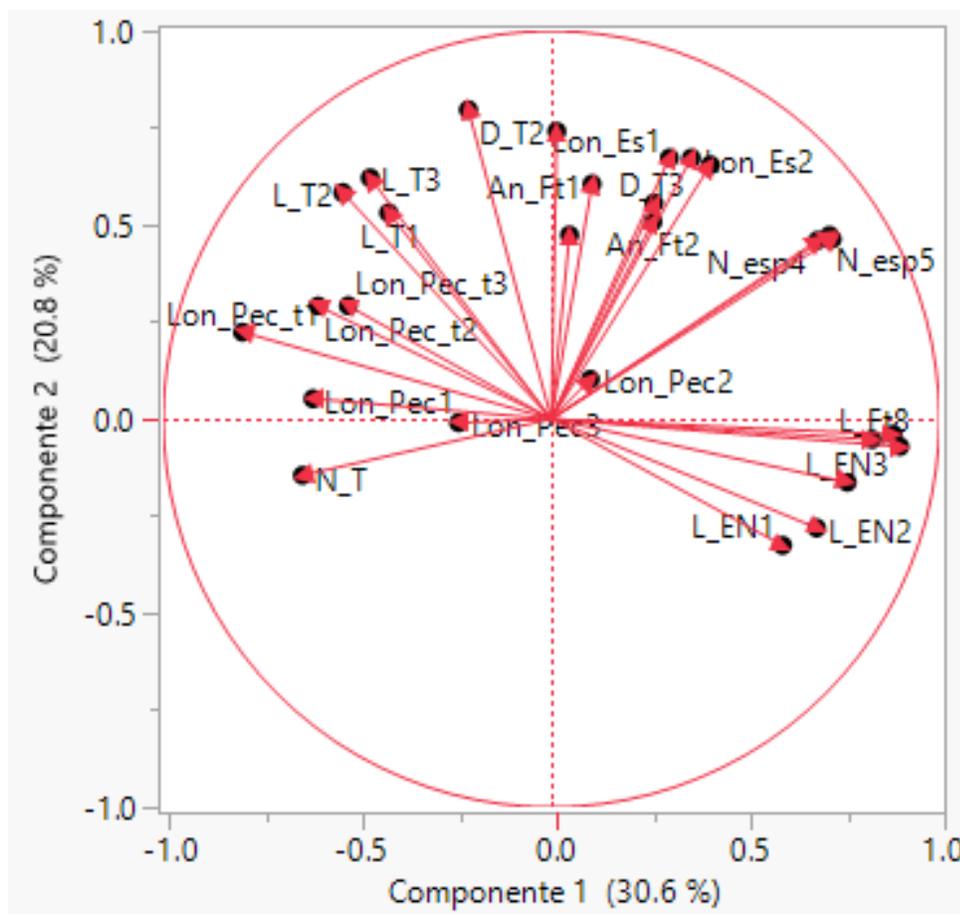


Figura 5. Medidas de correlaciones para variables cuantitativas en materiales de progenitores y cruzas de *Rubus* spp.

4.5.4. Análisis de agrupamiento de todas las variables

En el dendrograma obtenido (Figura 6) se observó la formación de dos grandes grupos, el grupo A de color rojo, representa a los híbridos obtenidos de la cruce *R. glaucus* x var. Tupy. El grupo B está formado por los híbridos de la cruce *R. glaucus* x *R. niveus* y por los tres progenitores.

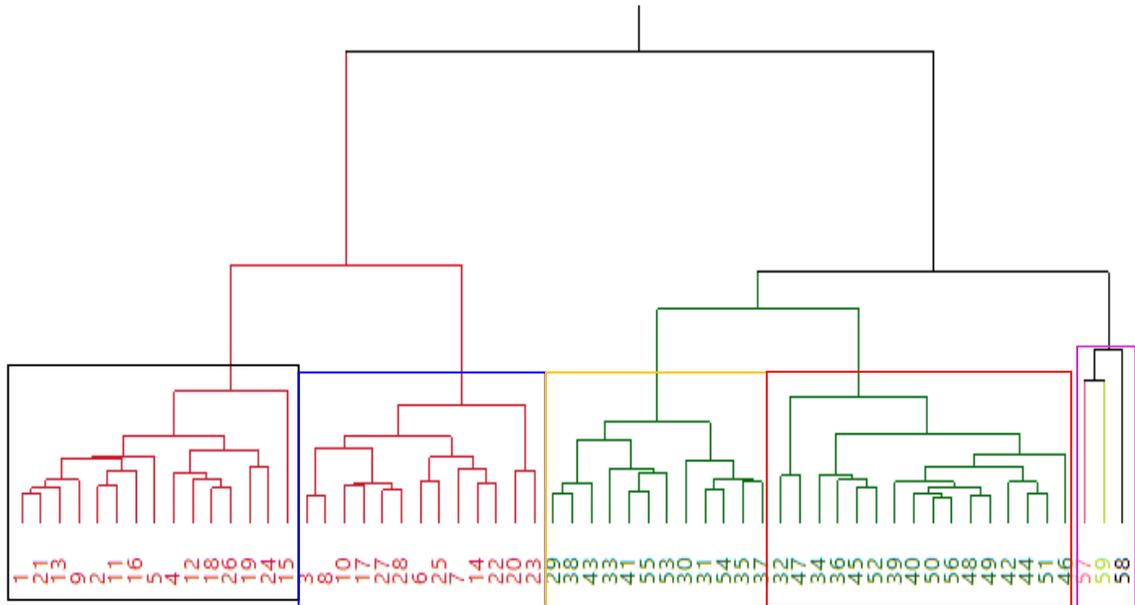


Figura 6. Dendrograma de distancia entre descriptores morfológicos de 59 accesiones de *Rubus* spp. Recuadro negro, grupo A1; recuadro azul, grupo A2; recuadro amarillo, grupo B1; recuadro rojo, grupo B2; recuadro fucsia, grupo B3.

Dentro de cada grupo se comparten características morfológicas similares tanto en hoja como en tallo, sin embargo, se formaron subgrupos donde se agruparon principalmente por la presencia o ausencia de espinas y por híbridos y progenitores, para un total de 5 subgrupos. El caso del grupo A se formaron dos subgrupos; el A1 está conformado por híbridos que tienen en común principalmente la presencia de espinas para un total 15 individuos que equivale al 53.57 % del total de híbridos de la cruce de *R. glaucus* x var. Tupy, son plantas con características muy parecidas al padre (var. Tupy) con 5 foliolos dispuestos en forma palmeada con tallos angulares y algunas con presencia antocianica en el tallo (Antunes, 2002). Un 46.43 % que equivale a 13 individuos sin espinas que conforman el subgrupo A2. Para el grupo B Se forman 3 subgrupos, el B1 conformados por 12 híbridos con espinas para un 42.85 % del total de híbridos evaluados de la cruce *R. glaucus* x *R. niveus*; el subgrupo B2 formado por 16 híbridos sin espinas para un total de 57.14 % y por último, el B3 formados por los progenitores (*R. glaucus*, *R. niveus* y var. Tupy).

El estudio de la variación genética de las plantas es esencial para el uso adecuado de los recursos fitogenéticos (Hegde et al., 2002). Iza et al. (2020)

mencionaron que cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente, también sean las más cercanas genéticamente, como es el caso del género *Rubus* que tiene una amplia distribución en el mundo, pero dichas especies han sido cruzadas por lo que se evidencia la cercanía genética entre progenitores e híbridos. En el subgrupo B3, el progenitor *R. niveus* se distancia de los otros dos progenitores, puede deberse a que pertenece al subgénero *Idaeobatus* donde se encuentran las frambuesas que se caracteriza por que sus frutos formados por drupeolas (polidrupas) no están unidos al receptáculo floral (Jennings, 1978) a diferencia de los otros dos progenitores que son zarzamoras.

En general, la presencia de espinas es un parámetro que se toma como característica esencial discriminante para distinguir las subfamilias de la familia Rosaceae. Lo cual se evidencia en el presente estudio en la forma de agrupamiento de los materiales evaluados con los descriptores morfológicos vegetativos. También es de importancia mencionar el aporte que hace Marulanda et al. (2012) al estudio del género *Rubus* donde las diferencias entre las características o variables son propias del género y de las especies que lo constituye, las cuales presentan gran variabilidad morfológica y genética, encontrándose en diferentes formas diploides hasta dodecaploides y con alto nivel de heterocigosis.

4.5.6. Pruebas de χ^2

Con la prueba de χ^2 se estimó la proporción fenotípica esperada igual 1:1. Donde las proporciones genotípicas se estiman para los progenitores de homocigoto recesivo para la característica de ausencia de espinas y heterocigota para los padres. Realizando el cuadro de Punnet se obtuvo una proporción de 50/50 o 1:1 como lo es el caso para la herencia de este carácter tan importante para la clasificación de los materiales evaluados.

Cuadro 9. Prueba de χ^2 para presencia de espinas en los híbridos de la F_1 de *R. glaucus* x *R. niveus* y *R. glaucus* x var. Tupy ($P < 0.05$).

Híbridos (<i>R. glaucus</i> x <i>R. niveus</i>)							
Clases fenotípicas	Valores observados	Valores esperados	ob-es	(ob-es) ²	(ob-es) ² /es	Valor de χ^2 Calculada	Valor de χ^2 Tabulada
12 (1/2) con espinas	12	14	-2	4	0.2857	0.5714	3.84
16 (1/2) sin espinas	16	14	2	4	0.2857		

Híbridos (<i>R. glaucus</i> x Var. Tupy)							
Clases fenotípicas	Valores observados	Valores esperados	ob-es	(ob-es) ²	(ob-es) ² /es	Valor de χ^2 Calculada	Valor de χ^2 Tabulada
15 (1/2) con espinas	5	14	1	1	0.0714	0.1429	3.84
13 (1/2) sin espinas	13	14	-1	1	0.0714		

ob: valores observados; es: valores esperados.

Con base a los resultados obtenidos con la prueba de χ^2 (Cuadro 9) evidencia que la generación F_1 segrega una relación de 1:1 para presencia-ausencia de espinas, manifestándose esta característica independiente a las demás, puesto que hay presencia y ausencia de espinas en plantas de la F_1 de ambas cruza donde los descriptores observados en campo como plantas trifoliadas o pentafoliadas, con tallo circular o angular, con un solo tallo principal o varios que presentan espinas o no.

4.6. Conclusiones

El estudio de la variabilidad morfológica permitió identificar los principales caracteres deseables para distinguir y agrupar los híbridos y los progenitores en grupos diferentes con características fenotípicas que representan la diversidad genética observable y medible. Algunos de ellos con características deseables como la ausencia de espinas que permitan un mejor desempeño en las labores

culturales en la zarzamora. Se identificaron individuos sin espinas que pueden ser incluidos como parentales en futuros programas de mejoramiento genético de la especie, y en los que se incluyan un mayor número de individuos, marcadores morfológicos reproductivos, la evaluación de la calidad de fruto, entre otros caracteres de interés agronómico.

Se estimó el tipo de herencia de algunas características como las espinas (presencia o ausencia) y el tipo de hoja (trifoliada, pentafoliada y heptafoliada). Por lo que se estima en la primera un tipo de herencia monogénica con una relación 1:1 que puede deberse a la homocigosis recesiva de la ausencia de espinas en la planta madre (*R. glaucus*) y la heterocigosis presentada por ambos progenitores machos en esta característica. En cuanto al tipo de hoja predominó el carácter pentafoliado en la descendencia de ambas cruzas.

4.7. Literatura citada

Antunes, L. E. C (2002). Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 32(1),151-158. doi.org/10.1590/S0103-84782002000100026

Cancino-Escalante, G. O., Sánchez-Montaña, L. R., 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. doi: 10.11144/Javeriana.SC16-3.pcor

Clark, J. R., Stafne, E. T., Hall, H. K., & Finn, C. E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding*, 29, 17-146. doi: 10.1002/9780470168035.ch2

Córdoba, O. & Londoño, J. (1996). Evaluación de seis materiales de mora *Rubus* spp., en condiciones de clima frío moderado. Trabajo de Grado (Ing. Agr) Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/17724>

Crisci, J. V., & López, M. F. (1983). *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica* 26, 39-67. Washington, D.C.: Secretaría de la Organización de Estados Americanos (OEA). https://www.researchgate.net/profile/JorgeCrisci/publication/50326234_Introduccion_a_la_teor%C3%ADa_y_practica_de_la_taxonomia_numerica/links/5a8c5da2458515a4068ad8f6/Introduccion-a-la-teoria-y-practica-de-la-taxonomia-numerica.pdf

- Espinosa B., N., Ligarreto M., G. A., Barrero M., L. S., & Medina C., C. I. (2016). Variabilidad morfológica de variedades nativas de mora (*Rubus* sp.) en los Andes de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 211-221.
- García, E. (2005). *Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen*. Distrito Federal: Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. Cuarta edición. 217 p.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF Secretariat). (2017). *Rubus* L. 2-12p. GBIF Backbone Taxonomy. doi:10.15468/39omei.
- Hao, D. A., Gu, X. J., & Xiao, P.G. (2015). *Potentilla* and *Rubus* medicinal plants: potential non-Camellia tea resources. In *Medicinal Plants, Chemistry, Biology and Omics*. 373-430.
- Hegde, S. G., Valkoun, J., & Waines, J. G. (2002). Genetic diversity in wild and weedy *Aegilops*, *Amblyopyrum*, and *Secale* species—a preliminary survey. *Crop Science*, 42(2), 608–614.
- Iza, M., Viteri, P., Hinojosa, M., Martínez, A., Sotomayor, A., & Viera, W. (2020). Diferenciación morfológica, fenológica y pomológica de cultivares comerciales de mora (*Rubus glaucus* Benth.). *Enfoque UTE*, 11(2), 47-57. doi: <https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.529>
- Jennings, D. L. (1978) The blackberries of South America—an unexplored reservoir of germplasm. *Fruit Varieties Journal*, 32(2), 61-63. <https://www.cabi.org/isc/abstract/19901610038>
- Jennings D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. London: Academic Press. 110 p.
- Khadivi-Khub, A. (2014). Assessment of cultivated cherry germplasm in Iran by multivariate analysis. *Trees*, 28(3), 669-685. doi:10.1007/s00468-014-0980-7.
- Marulanda, M. L., López, A. M., & Uribe, M. (2012). Genetic diversity and transferability of *Rubus* microsatellite markers to South American *Rubus* species. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, 11(1), 151-166.
- Rodriguez-Bautista, G., Ledesma Segura, S., Izquierdo, S., López-Medina, J., Gutierrez Espinosa, M. A., Cruz-Huerta, N., Carrillo-Salazar, J., & Valenzuela-Núñez, L. (2019). Distribution and morphological variability of blackberries species in Mexico (*Rubus* spp. L.). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud Biotecnia*, 21(2), 97-105. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i2.935>
- Rohlf, F. J. (2000). *Ntsys-pc Version 2.10 s (numerical taxonomy and multivariate analysis system)*. New York: Applied Biostatistics, Inc.

- Rzedowski, J., & Calderón de Rzedowski, G. (2005). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes, familia Rosácea*. 31, 135-163. <http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/documentos/fasciculos/ordinarios/Anacardiaceae%2078.pdf>
- Sall, J., Lehman, A., Stephens, M. L., & Creighton, L. (2017). *JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP*. Cary: Sas Institute Inc.
- Sánchez-Morales, José Antonio, Villares-Jibaja, Marlon Xavier, Niño-Ruiz, Zulay, & Ruilova, Maria B. (2018). Efecto del piso altitudinal sobre la calidad de la mora (*Rubus glaucus* benth) en la región interandina del Ecuador. *Idesia (Arica)*, 36(2), 209-215. <https://dx.doi.org/10.4067/S071834292018005000702>
- Sneath, P. H. A., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. 24(2), 263-268. <https://doi.org/10.2307/2412767>
- Solanas, A., Salafranca, L., Fauquet, J., & Núñez, M. I. (2005). *Estadística descriptiva en ciencias del comportamiento*. 1, 324-360. <https://portalrecerca.uab.cat/en/publications/estad%C3%ADstica-descriptiva-en-ciencias-del-comportamiento-4>
- Zamorano Montañéz, A., Morillo Coronado, Y., Morillo Coronado, A. C., Vásquez Ameriles, H. D., & Muñoz Flores, J. E. (2007). Caracterización morfológica de mora en los departamentos del Valle del Cauca, Cauca y Nariño. *Acta Agronómica*, 56(2), 51-60.