

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Evaluación de la variabilidad genética en cinco especies de mora (*Rubus* spp) mediante marcadores microsatélites
SSR**

Proyecto de Investigación

María Emilia Álvarez Rodríguez

Ingeniería en Agroempresas

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de
Ingeniera en Agroempresas

Quito, 15 de julio de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO CIENCIAS E INGENIERÍAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación de la variabilidad genética en cinco especies de mora (*Rubus*
spp) mediante marcadores microsatélites SSR**

María Emilia Álvarez Rodríguez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 15 de julio del 2016

© **Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María Emilia Álvarez Rodríguez

Código: 00105429

Cédula de Identidad: 1716791288

Lugar y fecha: Quito, 15 de julio del 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis papás, Cristóbal y Lucia por darme su confianza y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, gracias a ustedes he logrado superar varios obstáculos y ser la persona que soy ahora. A mi hermana María Paz, por ser mi mayor soporte, mi mejor amiga y la persona que más admiro. Gracias a mi familia, abuelitos, tíos y primos por su afecto y apoyo. A Esteban, por su colaboración y apoyo a lo largo de esta etapa de elaboración del proyecto de titulación. También quiero agradecer a mis profesores Eduardo Uzcategui, Raúl de la Torre, Mario Caviedes, Carlos Rúaes y Antonio León quienes me han brindado su apoyo y conocimiento a lo largo de de este proceso. Además quiero agradecer al laboratorio de biotecnología agrícola y alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, en especial a Noe, por brindarme su conocimiento y colaboración. Finalmente, a mis amigos y compañeros dentro de la Universidad.

RESUMEN

Se presenta los resultados de una estudio sobre la variabilidad genética en 5 especies de mora (*Rubus* spp.) mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites SSR. Se seleccionaron 5 especies de mora debido a sus características fenotípicas y a que en el Ecuador no se han realizado estudios previos que demuestren la variabilidad genética entre las 5 especies seleccionadas en este estudio. Las especies utilizadas para este estudio son, *Rubus niveus*, *Rubus adenotrichos*, *Rubus nubigenus*, *Rubus lancinatus* y *Rubus glaucus*. Se utilizaron dos especies dentro de la familia *Roseaceae*, con el fin de obtener mejor certeza de los resultados obtenidos. Estas especies fueron Rosa variedad "freedom" (*Rosa* sp) y frutilla variedad Albión. Para este estudio se evaluaron 8 marcadores microsatélites SSR para *Rubus* y un marcador control ITS2. Se extrajo el ADN de cada muestra, y por medio del proceso de PCR se amplificaron y se visualizaron los datos obtenidos. En el análisis descriptivo se identificaron un total de 32 loci, 100 alelos y un rango de alelos por locus de 2-6. En el análisis estadístico se obtuvo un rango de heterocigosidad observada (H_o) de 0.2-0.9, un rango de heterocigosidad esperada (H_e) de 0.37-0.95, y un contenido de información polimórfica (PIC) de 0.19-0.95. Se estableció que los mejores "primers" SSR en el estudio, basándonos en un porcentaje alto de H_o , H_e y PIC, fueron RhM003, Rubus 105b y Rubus 98d. Con el análisis en gel de agarosa al 1,2% se visualizaron los productos de la PCR, creando una matriz de bandas, en presencia (1) y ausencia (0), con estos resultados se elaboro un dendograma con el programa bioinformático DENDROUPGMA, el cual calcula la distancia genética entre cada una de las muestras. Por medio del dendograma se identificaron 3 clúster, en el primero se encuentra *Rubus nubigenus*, en el segundo los controles, rosa y frutilla, y en el tercero *Rubus niveus*, *Rubus adenotrichos*, *Rubus lancinatus* y *Rubus glaucus*. Por medio de los resultados obtenido, se determinó que la especie *Rubus nubigenus* es la que presenta mayor diversidad genética en comparación con las otras especies dentro del estudio, debido a esto se recomienda utilizar esta especie en proyectos de fitomejoramiento con el objetivo de obtener una variedad mejorada que presente características deseadas.

Palabras claves: variabilidad genética, *Rubus* spp., microsatélites, PCR, dendograma

ABSTRACT

The following results in this work present the genetic variability between 5 blackberry (*Rubus* spp.) species using molecular markers SSR (Simple Sequence Repeats). Five species were selected by their phenotypic characteristics and also because there are no previous studies that have shown the variability between the five species used for this study in Ecuador. The species that have been selected are *Rubus niveus*, *Rubus adenotrichos*, *Rubus nubigenus*, *Rubus lanciniatus* and *Rubus glaucus*. In addition, two species within *Roseacea* family were evaluated in order to have the reliability of the results. The two species are rose “freedom” and “albión” strawberry. For this work eight microsatellites, for *Rubus*, were isolated plus one used for Control (ITS2). DNA was extracted from all the samples and amplified through PCR. Data was visualized. In the descriptive analysis, a total of 32 loci and 100 alleles were identified and number of alleles per locus between 2 to 6. In the statistic analysis was evaluated the heterozygosity observed (H_o) with values between 0.2 to 0.9, heterozygosity expected (H_e) between 0.37 to 0.95 and polymorphism information content (PIC) between 0.19 to 0.95. It was established that the best primers microsatellites SSR in this study, based on high percentage of H_o , H_e y PIC, were RhM003, Rubus 105b and Rubus 98d. Analyzing the agarose 1,2% gel PCR products were visualized in order to create a binary matrix (1) in presence, (o) in absence of bands. With this matrix a dendogram was created using the internet software DENDROUPGMA, which calculates the genetic distance between each sample. They were identifies 3 clusters in the dendogram. In the first one is *Rubus nubigenus*, in the second one are the controls, rose and strawberry, and in the last one are *Rubus niveus*, *Rubus adenotrichos*, *Rubus lanciniatus* and *Rubus glaucus*. It was determined that *Rubus nubigenus* was the specie that presented the major genetic diversity among all the samples used in this study. This specie is recommended to introduce in plant breeding studies in order to obtain a new variety of blackberry with important agricultural characteristics.

Key word: genetic variability, *Rubus* spp., microsatellites, PCR, dendogram

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos.....	4
Resumen	5
ABSTRACT	6
Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras	11
I Introducción	12
1.1. Antecedentes.....	12
1.2. Justificación	13
II Objetivos e hipótesis.....	17
2.1 Objetivo General.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
2.3 Hipótesis	17
III Revisión de Literatura	18
3.1 Características Morfológicas y Taxonómicas del género <i>Rubus</i>	18
3.2 Especies de <i>Rubus</i> en el Ecuador.....	18
3.3 Métodos para identificar diversidad genética	20
3.3.1 Marcadores morfológicos.....	20
3.3.2 Izoenzimas.....	20
3.3.3 Marcadores moleculares.....	21
3.4 Estructura y extracción del ADN.....	21
3.4.1 Extracción de ADN	21
3.4.2 Método de Extracción de ADN con Bromuro de cetil-trimetil amonio CTAB. 23	26
3.4.3 Cuantificación del ADN.....	25
3.4.4 Electroforesis de ADN.....	26
3.5 Marcadores de ADN	26
3.5.1 Métodos que no se basan en PCR.....	26

3.5.2	Marcadores Moleculares que se basan en PCR	26
3.5.2.1	Microsatélites.....	28
IV	Materiales y metodos.....	30
4.1	Material Experimental	30
4.2	Extracción de ADN.....	30
4.2.1	Procedimiento.....	30
4.3	Cuantificación del ADN	32
4.3.1	Procedimiento:.....	32
4.4	Electroforesis	32
4.5	Técnica de PCR.....	32
4.5.1	Procedimiento.....	33
4.5.2	Primers utilizados	33
4.6	Análisis de los resultados.....	34
4.6.1	Descriptivo.....	34
4.6.2	Variables Estadísticas.....	35
V	Resultados.....	37
5.1	Representación de las muestras amplificadas mediante PCR en cada uno de los “primers” utilizados.	37
5.2	Análisis descriptivo de las variables	39
5.3	Representación de la variabilidad genética mediante un dendograma.	40
5.4	Distancia genética entre las especies utilizadas.	41
VI	Discusión	42
VII	Conclusiones y recomendaciones	45
7.1	Conclusiones	45
7.2	Recomendaciones	46
VIII	Anexos	47
8.1	Nomenclatura de las muestras en estudio.....	47
8.2	Componentes del BE (Buffer de Extracción)	47
8.3	Preparación del TAE 10X.....	47

8.4	Fotografía de ADN de los 5 genotipos de mora y los 2 controles a 50ng/mL.....	48
8.5	Matriz Binaria	48
8.6	Cálculo de la diversidad Genética de un marcador dominante	49
IX	LITERATURA CITADA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición reactivos PCR	33
Tabla 2.- Características de los 8 "primers" usados en <i>Rubus</i> spp.	34
Tabla 3.-Lista de los 8 microsatélites SSR (Secuencias Simples Repetidas SSR) evaluados en 5 especies de <i>Rubus</i> spp. y dos especies de <i>Rosaceae</i>	39
Tabla 4.- Distancia genética entre los genotipos de <i>Rubus</i> spp. y controles	41
Tabla 5.-Nomenclatura del material experimental	47
Tabla 6.- Componentes del Buffer de Extracción (BE) método CTAB	47
Tabla 7.- Matriz binaria en base a los resultados de PCR	48
Tabla 8.-Cálculo de la diversidad genética del primer 1 RhM011	49
Tabla 9.-Cálculo de la diversidad genética del primer 2 RhM003	49
Tabla 10.-Cálculo de la diversidad genética del primer 3 RhM017	50
Tabla 11.- Cálculo de la diversidad genética del primer 4 Rubus 76b	51
Tabla 12.-Cálculo de la diversidad genética del primer 5 Rubus 105b	52
Tabla 13.-Cálculo de la diversidad genética del primer 6 Rubus 259f.....	53
Tabla 14.- Cálculo de la diversidad genética del primer 7 Rubus 98d	53
Tabla 15.-Cálculo de la diversidad genética del primer 8 RiM019	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Representación simplificada de las membranas celulares.	24
Figura 2.-Rotura de la membrana celular y extracción del ADN genómico.	24
Figura 6.-Temperaturas de un ciclo de PCR.....	28
Figura 7.- Gel de agarosa al 1,2% de la reacción de PCR de los 8 primers más el control ITS2	37
Figura 8.- Dendograma de los 5 genotipos de <i>Rubus</i> spp y controles.....	40
Figura 9.- Gel de agarosa al 1,2% de las muestras del estudio a 50ng/mL.	48

I INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El género *Rubus* pertenece a la familia *Rosaceae*, es el género más extenso de esta familia ya alrededor de 500 especies lo conforman. Algunas especies dentro de este género son difíciles de clasificarlas por varias razones, incluyendo su alta capacidad de hibridación entre especies y debido a que algunas especies dentro de este género pueden generar semilla sin la necesidad de haber sido polinizadas. Dentro del género *Rubus* se encuentran 2 subgéneros domesticados *Idaeobatus* y *Eubatus*. Este género está compuesto por frambuesas, moras y frutas árticas, las cuales han sido utilizadas en programas de mejoramiento genético. El subgénero de *Rubus*, *Idaeobatus* se encuentra distribuido principalmente en Asia, en el este y sur de África, en Europa y Norte América. Mientras que el subgénero *Eubatus*, se encuentra principalmente distribuido en América del Sur, América del Norte y Europa (Graham y Woodhead, 2009).

Las especies del género *Rubus*, se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas de alta montaña tropical desde México hasta Ecuador, las especies del subgénero *Eubatus*, son conocidas como las moras de los Andes y se han reconocido 44 especies, nueve comestibles y más de 500 variedades (Cancino y otros, 2011).

La mora es una fruta muy apetecida tanto en el mercado nacional como en el internacional, es una fruta rica en vitaminas y minerales. En Ecuador se conocen numerosas especies de mora, las zonas óptimas para este cultivo en el país se encuentran en los valles del callejón interandino, principalmente en la provincia de Pichincha y Tungurahua. En la actualidad, en las provincias del Carchi e Imbabura ha cobrado importancia. Los principales destinos de las exportaciones ecuatorianas de mora en el periodo del 2004-2008 han sido Estados Unidos, España, Antillas Holandesas, Alemania y Holanda (Tamara, L; y Vallejo, I, 2009).

Algunas técnicas para la identificación molecular que se han utilizado en frutales constan de: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's), estos

fueron el primer tipo de marcador de ADN en ser estudiado. Esta técnica utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN en secuencias de reconocimiento específicas. Esta especificidad de secuencia implica que el tratamiento de una muestra de ADN con una enzima de restricción produzca el mismo conjunto de fragmentos siempre (Brown, 2007). Los VNTR's (número variable de repeticiones en tándem), son regiones de ADN que incluyen miles de pares de bases, una familia de VNTR's consta de una unidad secuencial "central" común, que es rica en G-C de 10 a 15 pares de bases (pb). Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD's), son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos del ADN en una gran variedad de especies. Los RAPD's se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pb a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios. Una vez incorporados los marcadores al gen de interés se realiza la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), este proceso es semejante a una fotocopia molecular ya que amplifica cientos de veces una misma secuencia específica de ADN. La PCR consiste en tres pasos; cada segmento de doble cadena es separado en dos cadenas sencillas por acción del calor, los segmentos de cadena sencilla se hibridan con iniciadores que complementan y definen la secuencia molde o blanco para ser amplificada. (Azofeifa A. , 2006).

1.2. Justificación

En el país los estudios de identificación molecular son escasos, en el caso de mora no hay estudios previos que demuestren la variabilidad genética entre las cinco especies seleccionadas. Así mismo, en el Ecuador la producción de mora se encuentra distribuida en tres especies importantes, la mora de Castilla, la mora variedad Brazos y recientemente la mora "INIAP Andimora 2013". Es importante realizar estos estudios para que exista conocimiento acerca de las propiedades que tienen las moras silvestres dentro del comercio en el país. La mora silvestre (*Rubus niveus*) del valle de Cumbayá y Tumbaco, es un arbusto

suberecto de hasta 5m de alto, presenta tallos glabrosos, cortantes y espinosos. En el Ecuador está distribuido en las regiones insular, Costa, Sierra y Amazonia en elevaciones que van desde 0-300 metros, en las provincias de Azuay, Esmeraldas, Galápagos, Loja, Napo, Pichincha, Sucumbíos y Zamora-Chinchipe (Landázuri, 2010). En los años 70 se introdujo a las islas Galápagos esta variedad de mora, *Rubus niveus*, con propósitos de producción en la isla San Cristóbal. No obstante esta variedad está siendo un problema ya que se ha difundido hacia las islas Santiago, Santa Cruz e Isabela. Esta variedad es considerada como una de las plagas más invasiva ya que está eliminando vegetación nativa, bosques, cultivos y es muy difícil de controlarla debido a su periodo vegetativo y al gran número de semillas que produce cada año (Castillo A. , 2008). *Rubus adenotrichos*, es un arbusto caducifolio trepador, presenta tallos angulados, peludos o vellosos y espinosos. Glándulas estipuladas de 1-5 mm de largo. Presenta estípulas cartáceas, subuladas y vellosas de 5-22 x 0.5-2 mm, peciolos vellosos de 30-80mm, hojas subcoráceas, penta-foliadas ovaladas u oblongas, 5-15 x 3-5 cm. Presenta una inflorescencia piramidal con panículas laxas, puede tener entre 20-100 flores, pedúnculos de 15-20 mm de diámetro. Sus flores son de 15-20 mm de diámetro pueden encontrarse rosadas o rosadas, tiene sépalos ovalados de 5-10 x 3-5 mm, sus frutos alcanzan un tamaño entre 8-12 x 5-10 mm y presentan un color negro-rojizo, en el Ecuador se encuentra en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha en elevaciones entre los 2600 a 3300 m.s.n.m (Romoleroux,1996).

Rubus nubigenus, es un arbusto trepador, presenta tallos cilíndricos, vellosos, estipulado con espinas semi ovaladas o articuladas. Presenta peciolos espinosos entre 15-50 mm, hojas coráceas tri-foliadas, folletos entre 5-15 x 3-9 cm ovadas a semi obavadas. Su inflorescencia puede ser laxa o compacta, puede tener entre 8-20 flores, pedúnculos de 5-25 mm de largo. Sus flores tienen entre 20-30 mm de diámetro, se las puede encontrar en color magenta o purpura. Sus frutos son ovoides-globosos, alcanzan un tamaño entre 15-30 x 10-25 mm. En Ecuador se encuentra en las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay, Loja, Sucumbíos, Napo, Morona-Santiago y Zamora-Chinchipe en elevaciones entre 2500 a 4200 m.s.n.m (Romoleroux,1996).

Rubus glaucus es una de las moras más importantes en el mercado Ecuatoriano, esta especie crece de México a Ecuador en tierras altas de los trópicos generalmente por arriba de los 800 msnm y se le cultiva de forma incipiente por los frutos. Es una planta perenne que emite ramas de un tallo corto, formando una macolla de hasta cinco metros de diámetro (León, 1987). Una mora interesante para el Ecuador es la mora “INIAP Andimora 2013” (*Rubus glaucus*), esta nueva variedad fue generada por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), esta variedad resultado de cruces entre individuos de la misma especie, la mora de castilla (*Rubus glaucus*). La variedad tiene características agronómicas importantes como sus altos rendimientos, ya que al no tener espinas su cosecha es más rápida y eficaz. Otro punto importante de esta nueva variedad es la concentración de azúcares, que es más alta de la que se ha venido cultivando en la zona central del Ecuador (Martínez, 2014).

La mora *Rubus lanciniatus*, variedad Brazos, es proveniente de Texas y se ha adaptado en nuestro país y es apta para exportación debido a su rusticidad y alta productividad. Presenta grandes racimos con frutos grandes, un tallo firme y espinoso. Sus frutos se caracterizan por ser dulces y jugosos. Es considerada una de las variedades comerciales más importantes debido a su productividad y resistencia a enfermedades (Whealy, 2001).

Es importante realizar este estudio debido a que en las distintas accesiones existen diferencias tanto fenotípicas como agronómicas. Las cinco especies en estudio; mora silvestre del valle de Tumbaco (*Rubus niveus*), mora silvestre del Piñan (*Rubus adenotrichos*), mora silvestre del Chaupi (*Rubus nubigenus*), mora variedad Brazos (*Rubus lanciniatus*) y la mora desarrollada por el INIAP, “INIAP Andimora 2013” (*Rubus glaucus*), las últimas dos producidas en la granja experimental de la Universidad San Francisco de Quito ubicada en Puembo, fueron seleccionados debido a su potencial uso dentro de la agricultura. La mayoría de los experimentos realizados en identificación molecular en mora (*Rubus* spp.) han sido mediante marcadores moleculares RAPD, ya que estos son muy útiles para identificar variedades dentro de una misma especie. El uso de estos marcadores difiere

de otros métodos de análisis por PCR debido a que en este se identifica una secuencia única de pequeño tamaño y se hace el apareamiento del PCR a bajas temperaturas, a pesar de ser un método simple y de bajo costo, tiene el inconveniente de ser un marcador de tipo dominante, es decir, no es posible discernir sobre la heterocigosidad de los *loci* observados y los resultados pueden diferir en distintos estudios debido a las condiciones de cada laboratorio (Hinrichsen, y otros, 2000).

En el presente estudio se va a identificar la distancia genética entre cinco genotipos de *Rubus* spp, es por esto que la técnica mediante microsatélites es una buena opción para identificar variabilidad genética entre las especies y con los datos obtenidos establecer su relación y distancia genética. También se utilizarán dos testigos dentro de la familia *Rosaceae*, los cuales servirán como controles, el primer testigo es rosa (*Rosa* sp.) variedad “Freedom” y el segundo es frutilla (*Fregaria x ananassa*) variedad Albión (Ornelas, y otros, 2013). Estos dos controles fueron seleccionados con el fin de obtener mayor certeza en cuanto a los resultados de variación genética existente dentro del género *Rubus*. Al momento de elaborar un dendograma se espera que los cinco genotipos más cercanos entre si y los dos controles en dos “clusters” diferentes. En el presente estudio se utilizará el método de marcadores moleculares de secuencias simples repetidas (SSR) seguidos por una amplificación de los mismos mediante la técnica de PCR. Esta técnica consiste en amplificar in vitro un fragmento de ADN específico, esta técnica cuenta con tres pasos, desnaturalización, alineamiento y extensión. (de Dios y Velasquillo, 2013).

Finalmente, por medio de este estudio, se puede evaluar la cercanía existente entre los cinco genotipos de mora. Con la información obtenida se pueden realizar posteriormente cruces entre los individuos que presenten mayor distanciamiento genético, con el fin de obtener una mora más rustica que cumpla con los estándares fenotípicos del mercado. Por lo tanto los estudios de variabilidad genética son importantes para poder establecer relaciones genéticas entre diferentes especies, así mismo para tener una biblioteca genética para futuros experimentos relevantes.

II OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1 Objetivo General

Evaluación de la variabilidad genética de cinco genotipos de mora (*Rubus* spp), utilizando marcadores microsatélites (SSR).

2.2 Objetivos Específicos

1. Recolectar e identificar botánicamente las distintas especies de *Rubus* usadas en este estudio.
2. Extraer el ADN de los 5 genotipos de *Rubus*
3. Amplificar con el “primer” ITS2 las muestras de ADN de los 5 genotipos.
4. Establecer las condiciones óptimas de concentración, temperatura, ciclos en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los 8 “primers” utilizados.
5. Elaborar un dendrograma en base a los resultados obtenidos utilizando un sistema binario de bandas.
6. Evaluar la distancia y relaciones genéticas presentes entre los 5 genotipos de mora (*Rubus* spp).

2.3 Hipótesis

Las cinco especies de mora mostrarán diferencias genómicas diferenciadas por grado de similitud y o diferencia con el uso de marcadores microsatélites de secuencias simples repetidas (SSR).

III REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Características Morfológicas y Taxonómicas del género *Rubus*

El nombre de este género fue asignado por Linnaeus en 1753, este género se encuentra dentro de la familia *Rosaceae*, corresponde a un grupo de lianas o subarbustos perennes de ramas escandentes o reclinadas, presentan hojas alternas, compuestas pueden ser trifoliadas a 5-palmeadas o pinnadas. Generalmente presentan espinas curvas tanto en los tallos como en los peciolo, los peciolo son largos, delgados y ligeramente acanalados. Presentan foliolos ovalados, cordados a oblongos de margen aserrada a crenada. La inflorescencia desde holocaulos con flores solitarias axilares, sustentadas por hojas de menor tamaño, a antoblastos monotélicos de tipo panícula o tirso. Sus flores son pentámeras con sépalos soldados en la base, usualmente con tricomas pétalos ovados, libres, blancos a rosados a rojos (Cancino y otros, 2011). Pueden ser arbustos trepadores, subarbustos o hierbas rastreras, el tallo y las ramas están frecuentemente provistas de espinas. Las hojas son simples y en su mayoría compuestas, poseen estipulas generalmente unidas al peciolo. Las características más relevantes de este género es la presencia de pubescencia, numero de foliolos y la forma y tamaño de las estipulas. La inflorescencia puede ser en panícula o racimo, axilar o terminal, ocasionalmente presentan flores solitarias, las flores son pentámeras y tienen numerosos estambres y carpelos. Sus frutos son agregados de drupeolas con un receptáculo no engrosado, presentan un color rojo en su mayoría. Sin embargo se pueden encontrar frutos negros (Romoleroux, 1988).

3.2 Especies de *Rubus* en el Ecuador

El género *Rubus* comprende de alrededor de unas 250 especies de plantas procedentes de Europa, Norteamérica, y Asia. Todas las especies de moras pertenecen a dos subgéneros, estos son: *Eubatus* y *Orobatus*. Estos subgéneros se encuentran en Sudamérica, y en el caso de Europa solo se encuentran especies correspondientes a una sola subsección del subgénero *Eubatus* (Graham y Woodhead, 2009).

El estudio de diversidad de especies, así como la taxonomía de este género es compleja, esto se debe a que no hay ningún trabajo de este tipo en el Ecuador. Así mismo, de acuerdo a estudios realizados en *Rubus*, en Europa y Norteamérica En el Ecuador, se han registrado 10 especies de moras nativas (Romoleroux, 1988). Entre las más comunes se encuentran *Rubus adenothallus*, esta especie se caracteriza por ser un arbusto trepador, presenta tallos con pelos glandulares rojizos, presenta pentafoliadas y trifoliadas, sus estipulas son angostas, su inflorescencia es una panícula, los pétalos pueden ser blancos o rosados, los frutos de esta especie son relativamente pequeños, rojizos o casi negros, se encuentra desde la provincia del Carchi hasta Loja, entre 2200 y 3500 msnm (Romoleroux, 1996). *Rubus coriaceus*, es una hierba o subarbusto rastrero, el tallo es glabrescente, sus hojas son enteras o trifoliadas con estipulas angostas, sus flores son solitarias y presenta pétalos rosados y sus frutos son pequeños y rojos, esta especie se ha registrado en las provincias del Carchi, Pichincha, Cotopaxi y Azuay a una altitud entre 3500 y 4000 m.s.n.m (Romoleroux, 1996). *Rubus glaucus*, la mora de Castilla, es una planta originaria de la región Andina de Ecuador y de otros países de América intertropical. La mora de castilla, conocida como mora negra o mora andina, es la de mayor importancia comercial y la más cultivada en Ecuador, en regiones comprendidas entre los 1200 a 3000 m.s.n.m. La mora de castilla es conocida como la mora de Quito ya que es un frutal nativo del Ecuador, debido a su nombre, castilla, se piensa que fue introducida desde España. Sin embargo fue recolectada por primera vez en las laderas del volcán Pichincha (Concejo Metropolitano de Quito, 2012). *Rubus bogotensis* o mora negra, esta variedad es ideal para altitudes que van desde 1700 a 3200 m.s.n.m. cuyos frutos son racimos muy apretados y con poco jugo. *Rubus giganteus* o mora de paramo o de gato, generalmente se cultiva en altitudes entre 2600 a 3400 m.s.n.m. El receptáculo interno que posee los frutos es hueco y de granos grandes aproximadamente de 7cm. *Rubus megalococus* o mora pequeña, es una variedad rústica cuyos frutos se caracterizan por ser pequeños. Se cultiva hasta los 2700 m.s.n.m. Mora grande (*Rubus nubigenus*), Esta variedad posee frutos grandes y se cultiva desde los 2600 a 3100 m.s.n.m (Delgado, 2012).

La mora variedad Brazos (*Rubus lanciniatus.*), esta variedad fue desarrollada en 1959 en Texas, es la más productiva y adaptable, se la encuentra en el suroeste de los Estados

Unidos. Brazos es el resultado de un cruce de híbridos de alta calidad como dewberries y raspberries (Perkins-Veazie, 2015). Esta variedad se ha adaptado en Ecuador y es apropiada para la exportación debido a su rusticidad y alta productividad, además esta variedad es la de mayor demanda en el mercado internacional.

3.3 Métodos para identificar diversidad genética

Existen tres clases de marcadores genéticos: los morfológicos, las izoenzimas y los moleculares (Tanksley S. , 1983) .

3.3.1 Marcadores morfológicos.

Los marcadores morfológicos están basados en la expresión de caracteres fenotípicos. Se sabe que locus es la posición de uno o varios genes dentro de un cromosoma. Cuando existe un loci con mutaciones importantes suelen asociarse con variaciones fenotípicas, es por esto que sirven como marcadores de los segmentos cromosómicos que contienen esos loci. Debido a que el número de marcadores morfológicos es relativamente bajo, solamente se analiza en una pequeña parte del genoma (Pérez y Cornejo, 2014).

3.3.2 Izoenzimas.

Las izoenzimas son variantes de una misma enzima, que comparten un sustrato común pero difieren en su movilidad electroforética. Estas fueron los primeros marcadores moleculares utilizados en genética de plantas (Tanksley, Medina, y Rick, 1981). Desde su descubrimiento en 1957 han jugado un papel importante en muchas áreas de la biología. A pesar de sus aportes, en la actualidad su uso es limitado debido al escaso número de colorantes enzimáticos disponibles y por la imposibilidad de contar con suficientes marcadores como para cubrir completamente un genoma. Las isoenzimas solo representan una estrecha fracción del genoma total de la planta (Othaix, 2012).

3.3.3 Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares por otra parte, son fenotípicamente neutros y presentan una mayor segregación o polimorfismos que los morfológicos. Estos pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo, usando toda o una parte de la planta. Aparentemente están libres de efectos epistáticos y virtualmente se puede evaluar un número ilimitado de ellos (Phillips, Rodríguez, y Fritz, 1995).

3.4 Estructura y extracción del ADN

El ADN es una molécula grande compuesta por nucleótidos, cada nucleótido contiene un grupo fosfato un azúcar y cinco carbonos llamado desoxirribosa y una base nitrogenada. Los nucleótidos se encuentran unidos por enlaces entre el grupo fosfato de un nucleótido y el azúcar del siguiente nucleótido. El modelo de ADN que se conoce en la actualidad fue desarrollado por James Watson y Francis Crick en el año 1953.

Los cromosomas están formados por genes, los segmentos de ADN que son las unidades de la herencia. Los genes controlan el desarrollo de características como el color del pelo, de los ojos, tipo de sangre y color de la piel. Generalmente se dice que los genes se encuentran en los cromosomas no obstante, los genes son parte de los cromosomas ya que estos se encuentran enlazados en los cromosomas (Alexander y otros, 1992).

3.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN en plantas, consiste en el paso inicial de análisis genético. El tejido que se utilice para la extracción depende de la especie en estudio, existen varios protocolos de extracción (Henry, 2001). El procedimiento básico de la extracción de ADN se puede dividir en cinco pasos, algunos de los cuales se realizan simultáneamente dependiendo del protocolo que se utilice. Estos pasos son; Ruptura de células, eliminación de proteínas, eliminación de ARN, eliminación de proteínas y concentración de ADN. Entre los métodos de lisis o ruptura celular más utilizados están: detergentes, los detergentes aniónicos se utilizan básicamente para extraer ADN de parásitos, células en cultivo y tejido, siendo el dodecil sulfato de sodio (SDS), Nonidet-P40 (NP40) y sarkosil unos de los más

usados para la ruptura de la membrana celular. Se pueden utilizar enzimas, estas se utilizan especialmente para la extracción de ADN bacteriano, total o plasmídico, siendo la lisoenzima la enzima de elección. También existen los agentes desnaturantes, estos se utilizan para extraer ADN de diferentes tipos celulares y tejidos, siendo el cloruro de guanidina uno de los más empleados (Rocha, 2002).

Se lleva a cabo mediante el uso de enzimas proteolíticas como la proteinasa K. Algunos protocolos de extracción realizan la lisis con detergentes como el SDS en presencia de la proteinasa K en un solo paso. Así mismo, se acompaña del uso de la sal disódica del ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) para inhibir la acción de las ADNasas. Para organismos ricos en glicoproteínas como las microbianas y tripanosomas, entre otros, luego de la digestión se realiza un tratamiento con el detergente catiónico bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CETAB), con el fin de eliminar las glicoproteínas y obtener un ADN más puro (Somma, 2007).

La desproteínización se lleva a cabo con solventes orgánicos tales como el fenol y cloroformo, los cuales tienen propiedad de desnaturar las proteínas. El fenol debe ser bidestilado, equilibrado y protegido contra la oxidación mediante la adición de 8-hidroxiquinolina. Por otra parte, al cloroformo se le adiciona alcohol isoamílico en proporción 24:1 volumen a volumen (v:v) con el fin de evitar la producción de espuma y facilitar la separación de las fases acuosas orgánicas. Estos solventes se utilizan de 1:1 (v:v) de la muestra que se pretende limpiar, quedando las proteínas desnaturadas en la interfase y el ADN en la fase acuosa (UNMP, 2011).

La eliminación de ARN se realiza mediante digestión del ARN con ARNasas para eliminar en su totalidad la presencia de ARN. Este paso en algunos protocolos se realiza después de haber terminado el procedimiento de extracción del ADN (Zavala, 2009).

Concentración del ADN.

Se logra mediante la precipitación con etanol, este en presencia de estos cationes induce un cambio estructural en el ADN que causa la agregación y precipitación del mismo. Adicionalmente, con este tratamiento se remueven los residuos de fenol y cloroformo. Entre

las sales más utilizadas se encuentran el acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio y cloruro de litio (Puerta y Ureña, 2005).

3.4.2 Método de Extracción de ADN con Bromuro de cetil-trimetil amonio CTAB.

Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) fue elaborado por Murray y Thompson el 1980, este protocolo es uno de los más usados para extraer tanto ADN de vegetales como de alimentos derivados de los mismos. Con este método se eliminan polisacáridos y compuestos polifenólicos que podrían alterar la pureza del ADN de la muestra de estudio (Pérez A. , 2011). El CTAB, es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica (BIO BASIC INC, 2015).

Las células vegetales pueden lisarse utilizando el detergente iónico CTAB, este forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino. De este modo, los polisacáridos, compuestos fenólicos y otros posibles contaminantes permanecen en el sobrante y pueden ser eliminados mediante lavados. El ADN se solubiliza aumentando la concentración salina y se precipita con etanol o isopropanol. Las etapas de este método consisten en lisis de la membrana celular, extracción del ADN genómico y precipitación del ADN (Castillo M. , Extracción de ADN, 2014).

La primera etapa de la extracción de ADN consiste en la rotura de la membrana celular y nuclear, para esto se debe homogenizar la muestra con un tampón o “buffer” de extracción, que contenga EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), Tris-HCl (clorohidrato de Tris) y CTAB. Todas las membranas biológicas están compuestas por moléculas de lípidos y proteínas unidas por enlaces no covalentes.

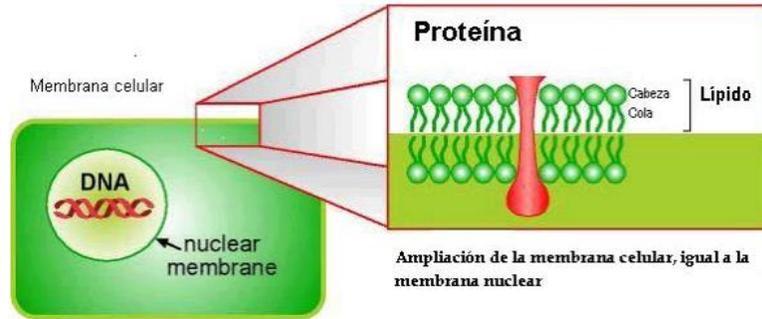


Figura 1.-Representación simplificada de las membranas celulares. (Castillo M. , 2014)

Las moléculas lipídicas están formadas por extremos hidrofílicos (cabezas) y extremos hidrófobos (colas). En este método, el detergente CTAB provoca la lisis de la membrana capturando los lípidos que integran la membrana celular y nuclear y se libera el ADN, como se representa en la figura 2. El EDTA es un componente quelante que se une al magnesio, el cual es un cofactor en la desoxirribonucleasa. Al unirse el magnesio al EDTA disminuye la actividad de la desoxirribonucleasa. El Tris-HCl sirve como un amortiguador del pH. El tiempo entre la homogenización de la muestra y la adición del buffer debe ser lo más corto posible (Castillo M. , Extracción de ADN, 2014).

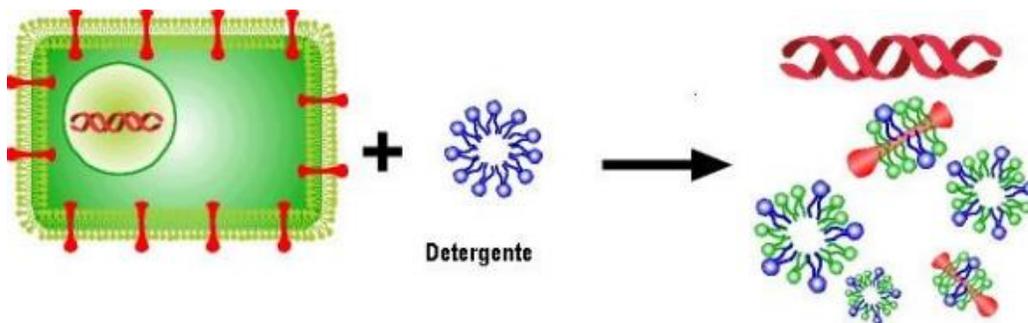


Figura 2.-Rotura de la membrana celular y extracción del ADN genómico (Castillo M. , 2014).

Durante la etapa de extracción, los complejos formados por los ácidos nucleicos y el CTAB de los polisacáridos, los compuestos fenólicos, proteína y demás lisados celulares disueltos en la solución acuosa se separan. Es importante eliminar los polisacáridos y los componentes fenólicos ya que estos pueden inhibir otras reacciones enzimáticas. El cloroformo desnatura las proteínas y facilita la separación de la fase acuosa y orgánica. La extracción con cloroformo se puede realizar de dos a tres veces para eliminar por completo las impurezas de la fase acuosa (Castillo M. , Extracción de ADN, 2014).

La precipitación consiste en la última etapa de la extracción de ADN, en esta se separan los ácidos nucleicos del detergente, para lo cual se agrega una solución de precipitación compuesta por una mezcla de CTAB y NaCl a una concentración elevada. En estas condiciones, el detergente al ser más soluble que el alcohol puede ser eliminado mediante lavados mientras que los ácidos nucleicos se precipitan, este paso está representado en la figura 3. El paso final consiste en agregar etanol al 70% ya que permite una mejor purificación de los ácidos nucleicos (Castillo M. , Extracción de ADN, 2014).

3.4.3 Cuantificación del ADN.

Existen varias técnicas para determinar la concentración del ADN, las dos principales son la cuantificación por comparación en electroforesis y la espectrofotometría.

La cuantificación del ADN se puede estimar utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm), ya que las bases puras y pirimidínicas del ADN absorben la luz a esta longitud. La pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de las en las longitudes de 260 y 280 nm. Una unidad (u) de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 50µg/ml de ADN de doble cadena, 40µg/ml de ARN y ADN de cadena simple, y a 20µg/ml de oligonucleótidos. La DO 260/280 en preparaciones puras de ADN y ARN tienen una relación ideal de 1,8 a 2,0 (Puerta y Ureña, 2005).

3.4.4 Electroforesis de ADN

En la actualidad es posible visualizar las moléculas de ADN mediante electroforesis. Esta técnica se genera sometiendo distintas moléculas de ADN, dentro de pocillos de un gel, a la fuerza de un campo eléctrico. De esta manera el ADN se separa en base a su tamaño por un efecto cribado producido por la “malla molecular” del gel. El gel utilizado puede ser de agarosa o de poliacrilamida. Esta técnica solamente puede separar moléculas con un tamaño máximo de 50.000pb.

Para separar moléculas de mayor tamaño se recomienda recurrir a una variante conocida como electroforesis de campo pulsante (Oliva y otros , 2004).

3.5 Marcadores de ADN

Se componen de 2 categorías. La primera categoría son los métodos que no se basan en la (PCR), en la segunda categoría se encuentran los métodos que utilizan PCR (Azofeifa Á. , 2006).

3.5.1 Métodos que no se basan en PCR

Estos formatos de amplificación pueden dividirse en dos amplias categorías, las cuales son los que amplifican la señal utilizada para detectar el ácido nucleico diana y los que amplifican directamente el ácido nucleico diana pero no se basan en la PCR. Un mecanismo de este tipo es la reacción en cadena de la ligasa (LCR), esta técnica se basa en el uso de dos pares de sondas que abarcan la secuencia diana en estudio. Después de este emparamiento queda un espacio entre las dos sondas que se cierra por vía enzimática mediante una ligasa. Al aplicar calor a las sondas se libera la cadena única que es complementaria al ácido nucleico diana (Forbes, Sahm, y Weissfeld, 2007). Los marcadores que utilizan este método son los RFLP Y VNTR's.

3.5.2 Marcadores Moleculares que se basan en PCR

El método de reacción en cadena de la polimerasa, proviene de sus siglas en inglés *polymerase chain reaction* (PCR), fue desarrollado en 1985. Es un método que permite amplificar hasta un millón de veces secuencias de ADN definidas, a partir de pequeñas

cantidades de ADN, utilizando primers complementarios en los extremos 5' y 3', ADN polimerasa y desoxinucleótidos. Se lleva a cabo mediante una maquina automatizada denominada termocicladora (Passarge, 2009). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido uno de los avances más importantes dentro del campo de la biología molecular. Los protocolos originales de las reacciones se realizaban utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I presente en *E.coli*. Debido a que la temperatura no coincidía con la temperatura específica del oligonucleótido utilizado, los resultados eran frecuentemente inadecuados. Mediante el descubrimiento de la ADN polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), se perfecciono esta técnica (González y Zavala, 2005).

La Taq polimerasa es una enzima proveniente de una bacteria que vive en aguas termales. Durante el proceso de PCR, el ADN se calienta para separar las cadenas y la enzima, al ser termófila, sigue activa a altas temperaturas. Se usan dos fragmentos (oligonucleótidos) de cadena sencilla llamados primers o cebadores, estos son ql equivalente al oligonucleótido que sintetiza in vivo la primasa para que la ADN polimerasa continúe la replicación del ADN. A partir de ellos, la Taq polimerasa detecta la presencia del oligonucleótido pegado en las cadenas abiertas del ADN e inicia el reclutamiento de bases complementarias (Orozco, 2008).

Cada ciclo de PCR consta de 3 etapas principales a distintas temperaturas (Figura 6): la primera etapa es la desnaturalización del ADN para separar la doble cadena y obtener cadenas o hebras sencillas, este proceso se obtiene con una temperatura de 94°C. La segunda etapa es hibridación, templado o anillamiento, es específico de cada hebra sencilla con un oligonucleótido predeterminado, generalmente se da a los 60°C y. La tercera etapa es la replicación, elongación o extensión de la hebra sencilla de por medio de un ADN polimerasa (Taq polimerasa) a partir del oligonucleótido específico llamado cebador o “primer”, este proceso ocurre en 72°C.

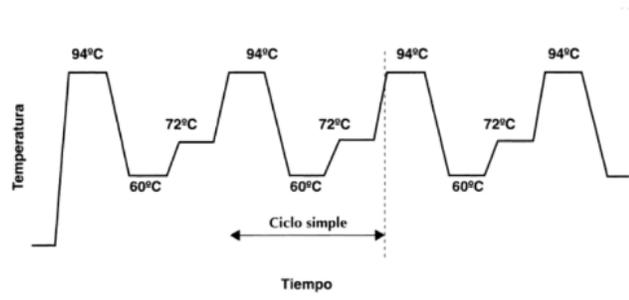


Figura 3.-Temperaturas de un ciclo de PCR

El proceso de PCR es un proceso exponencial debido a que duplica el número de moléculas correspondientes a la región a amplificar, por lo que después de 25 ciclos podemos calcular que partiendo de 1 molécula de ADN se obtendrán un total teórico de $3,3 \times 10^7$ moléculas. Cada ciclo se realiza en 3 minutos por lo que 20 ciclos pueden complementarse en tan solo 1 hora (Oliva y otros 2004). Dentro de los marcadores que se amplifican por PCR se encuentran los microsatélites.

3.5.2.1 Microsatélites.

Los marcadores microsatélites, también llamados SSR de sus siglas en inglés (short tandem repeat), son secuencias cortas repetidas en tándem Pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Los microsatelites son abundantes y también se han encontrado identificados en genomas de eucariotas.

Presentan herencia mendeliana simples son codominantes, esto significa que se pueden diferenciar los individuos homocigóticos y los individuos heterocigotos. Su genotipado resulta relativamente fácil y automatizable con la posibilidad de realizar múltiples amplificaciones en una misma reacción de PCR. Con resultados fiables y repetitivos. Se ha estimado que la tasa de mutación de los microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación (González E. , 2003). El elevado polimorfismo de los marcadores SSR se atribuye a dos mecanismos de mutación, el primero es el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN y el segundo es el entrecruzamiento desigual. Son considerados como

los marcadores genéticos más importantes en mejoramiento vegetal y en algunos cultivos importantes para la agricultura debido a que existe una gran colección de marcadores SRR utilizados para experimentación (Lörz y Wenzel, 2008).

IV MATERIALES Y METODOS

4.1 Material Experimental

Para el siguiente estudio se seleccionaron plantas de especies silvestres y variedades comerciales, para analizar variabilidad genética. Después se recolectaron hojas de *Rubus niveus* (valle de Tumbaco), *Rubus nubigenus* (Chaupi), *Rubus adenotrichos* (Piñan), *Rubus lanciniatus* variedad Brazos y *Rubus glaucus* “INIAP Andimora 2013”, las últimas dos cultivadas en la granja experimental de la Universidad San Francisco de Quito, ubicada en Puembo. Las hojas recolectadas se las almacenaron en la congeladora WiseCryo (MIDCIS) a -80°C hasta su uso. La nomenclatura de las muestras se encuentra en el anexo 8.1.

Para los tratamientos control se utilizaron hojas de Rosa (*Rosa* sp.) variedad “Freedom” y hojas de frutilla (*Fregaria x ananassa*) variedad Albión.

4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN es el paso inicial para continuar otros procesos, como el de identificación genética, es por esto que la extracción del mismo debe ser ejecutada de la mejor manera posible, ya que esta es la etapa clave para que un proyecto tenga éxito. Para este proceso, se utilizó el protocolo de extracción del laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito (Laboratorio de Biotecnología Agrícola, 2015).

4.2.1 Procedimiento

- Preparación del buffer de Extracción (BE), cuya composición se encuentra en el anexo 8.2.
- Precalentar el buffer de extracción a 65°C

- Se maceraron las hojas frescas con nitrógeno líquido (N_2) y se colocó el polvo hasta la mitad de un microtubo de Eppendorf.
- Se agregaron 500 μ L de BE, previamente calentado, se homogenizo la mezcla mediante el Vórtex Hobein y se lo llevo a incubar en baño maría (Fisher Scientific) por 30 minutos a 60°C .
- Se centrifugo la mezcla a 13000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos. Se recupero la fase acuosa en un nuevo microtubo.
- Se agregaron 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 24:1. se homogenizo la muestra con el vórtex y se volvió a centrifugar a 13000rpm por 10 minutos.
- Se recuperó la fase acuosa y se la colocó en un nuevo microtubo y se agregaron 500 μ L de isopropanol frio (-20°C). Se mezclo cuidadosamente por inversión y se lo dejo incubar a temperatura ambiente por un periodo de 10 minutos.
- Se centrifugo la mezcla a 10000rpm por 5 minutos y se descartó la fase acuosa.
- Se lavo el pellet con 500 μ L de etanol al 75% y 500 μ L de Acetato de Amonio, NH_4Ac 10mM. Se centrifugo a 10000rpm por 5 minutos y se descarto nuevamente la fase acuosa.
- El pellet obtenido se disolvió con 250 μ L de agua destilada estéril y se agregaron 50 μ L de Acetato de Sodio, $NaAC$ 3M (pH 5.2) y 500 μ L de isopropanol o etanol al 98%, se incubo la mezcla por un periodo de 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugo a 10000rpm por 5 minutos y se descarto la fase acuosa. Se lavo el pellet con alcohol al 70% y se centrifugo a 10000rpm por 5 minutos y se descarto la fase acuosa.
- Se seco el pellet por un periodo de 1 hora, hasta que se elimino el olor de etanol, se disolvió en 50 μ L de agua estéril.
- Para la eliminación de RNA, se agregaron 5 μ L de la enzima RNAsa y se incubo en baño maría por 1 hora a 37°C .
- Las muestras se almacenaron a -20°C .

4.3 Cuantificación del ADN

Para visualizar la pureza de ADN en cada muestra se utilizó el espectrofotómetro NANODROP (Thermo scientific) con relaciones de Absorbancia 260/280 y 280/260.

4.3.1 Procedimiento:

- Se seleccionó una longitud de onda de 260/280 y 280/260.
- Se encendió el espectrofotómetro con 0,5 μ L de blanco, el cual es la sustancia en la que el ADN se encuentra suspendido.
- Se colocaron 0,5 μ L del ADN de cada muestra.

4.4 Electroforesis

Para determinar la pureza del ADN en gel, se utilizó gel de agarosa al 1,2% en “buffer” TAE 1X (Anexo 8.3), teñido con Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega). (Laboratorio de Biotecnología Agrícola, 2015). Para un correcto análisis de las reacciones de PCR se homogenizaron las muestras a una concentración de 50ng/ml.

Procedimiento

Se pesó 1,2g de agarosa y se disolvieron en 60mL de TAE 1X, se lo calentó hasta que llegue a ebullición. Se lo mantuvo con agitación hasta que su temperatura llegue a 40°C, para poder colocar el Diamond™ Nucleic Acid Dye. Una vez listo se dispuso el gel en el pocillo hasta que se solidifique. Una vez listo, se sumergió al gel en la cámara de electroforesis Labnet, se colocaron aproximadamente 250 ml de TAE 1X y se cargaron las muestras en cada pocillo, 2 μ L de colorante y 4 μ L de muestra. Se corrió el proceso a 80V por 45 minutos.

Una vez terminado el proceso se visualizó el gel en el Fotodocumentador Enduro-Labnet.

4.5 Técnica de PCR

Para la técnica de amplificación se utilizó el termociclador LABNET MULTIGENE.

Se realizó un volumen final de reacción de 12,5 μ L, la composición de los reactivos se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 1.- Composición reactivos PCR

Reactivo	Cantidad
ADN (50ng)	0,4 μ L,
Buffer (5X)	1 μ L
dNTP's (10 mM)	0,4 μ L,
MgCl ₂ 25 (mM)	0,8 μ L,
Primer 1 (pmol)	0,25 μ L,
Primer 2 (pmol)	0,25 μ L,
Taq Polimerasa	0,2 μ L,
Volumen Total	1,5 μ L,

4.5.1 Procedimiento

Se mezclaron todos los componentes mencionados en la tabla 1, se colocaron las muestras en el termociclador y se programaron las temperaturas y tiempos de cada ciclo. Como control se utilizo agua PCR estéril, para tener la certeza que los componentes de la mezcla reaccionen de manera adecuada. Las reacciones de PCR fueron las siguientes:

El número de ciclos programados: 33

- Desnaturalización: 94°C por 1 minuto
- Annealing: 50-60°C dependiendo del primer (Tabla 2) por 1 minuto
- Extensión: 72°C por 1 minuto
- Extensión Final a 72°C por 10 minutos

4.5.2 Primers utilizados

Los primer utilizados se seleccionaron en base a estudios previos realizados en mora, los cuales utilizaron 20 marcadores microsatélites SSR específicos para *Rubus* spp. En el estudio se menciona que los mejores primers son los que tengan alto porcentaje de Heterocigosidad esperada, observada y contenido de información polimórfica (Marulanda, Lopez y otros 2012).

En la tabla 2 están presentados los 8 primers seleccionados en base a los estudios previos que se han realizado en mora. También se selecciono el marcador ITS2 que es

utilizado como control para identificar la pureza del ADN, ya que sirve como código de barras en todas las plantas vasculares.

Tabla 2.- Características de los 8 "primers" usados en *Rubus* spp. Fuente: (Marulanda, y otros, 2012), ** (Gu, y otros, 2013)

No	Locus	Motif	Secuencia de Primer	T° Annealing °C	Tamaño (pb)
1	RhM011	(TC)	F-AAAGACAAGGCGTCCACAAC R-GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	56	280
2	RhM003	(TG)	F-CCATCTCCAATTCAGTTCCTCC R-AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC	52	200
3	RiM017	(TG)	F-GAAACAGGTGGAAAGAAACCTG R-CATTGTGCTTATGATGGTTTCG	58	194
4	Rubus 76b	(CT) (CT)	F-CTCACCCGAAATGTTC AAC R-GGCTAGGCCGAATGACTACA	51	190-210
5	Rubus 105b	(AG)	F-GAAAATGCAAGGCGAATTGT R-TCCATCACCAACACCACCTA	58	165-173
6	Rubus 259f	(CT) (AG)	F-TGGCACAAGAAGCCTGTAAC R-TCCCATATCCCTCAGCATTC	58	265
7	Rubus 98d	(GAA) (GA)	F-GGCTTCTCAATTTGCTGTGTC R-TGATTTGAAATCGTGCGGTTA	51	198
8	RiM019	(AG)	F- ATTCAAGAGCTTAACTGTGGC R- CAATATGCCATCCACAGAGAAA	58	176
**	ITS 2	CONTROL	ITS2-S2 F- ATGCGATACTTGGTGTGAAT ITS4 TCCCTCCGCTTATTGATATGC	60	600

4.6 Análisis de los resultados

4.6.1 Descriptivo

El análisis descriptivo consiste en analizar los resultados obtenidos mediante la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) .Con los resultados obtenidos de cada primer se genero una matriz binaria que describa la presencia (1) y ausencia (0) de bandas.

Para la creación del dendograma se utilizó el programa UPGMA, sus siglas en inglés, *Unweighted Pair Grouping Method with Arithmetic-mean* que se encuentra disponible en internet. Esto significa que es un método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada. Es un método de clasificación por medio de algoritmos, en el cual se identifican las parejas más similares y el cálculo de la media de las distancias entre ellas y con el resto de individuos para construir un árbol (Gronau y Moran, 2007). Por medio de la matriz binaria de bandas, se colocan los datos en el programa y este calcula la diferencia entre clústers, los resultados se encuentran en la figura 5 y tabla 4.

4.6.2 Variables Estadísticas

Proporción de loci polimórfico, es el número de loci polimórficos dividido por el número total de loci (polimórficos y monomórficos) y se expresa en la siguiente fórmula.

$$P = n_{pj}/n_{total}$$

Donde, p representa la proporción de loci polimórficos, n_{pj} el número de loci polimórficos y n_{total} el número total de loci. Este expresa el porcentaje de loci variables en una población y su cálculo se basa en el conteo directo de los loci polimórficos (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1991).

Heterocigosidad observada, se identificó mediante la siguiente fórmula.

$$H_o = \frac{\text{individuos heterocigotos}}{\text{número total de individuos analizados}}$$

(Franco e Hidalgo, 2003).

La heterocigosidad esperada, es la probabilidad que dos alelos tomados al azar dentro de una población sean diferentes, se representa en la siguiente fórmula.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k X_i^2$$

Donde X_i representa la frecuencia del alelo i ; y k representa el número de alelos totales (Nei, 1973).

El Contenido de Información Polimórfica, Es una medida de la normatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Para un marcador genético, la probabilidad de que un descendiente de una pareja sea informativo esto quiere decir que se pueda deducir el origen parental de cada uno de los alelos de ese locus (Botstein y otros, 1980). Su ecuación es la siguiente:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k X_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} X_i^2 - \sum_{j=i+1}^k 2X_i^2 X_j^2$$

Donde k es el numero de alelos y x_i, x_j son las frecuencias de los alelos i y j.

V RESULTADOS

5.1 Representación de las muestras amplificadas mediante PCR en cada uno de los “primers” utilizados.

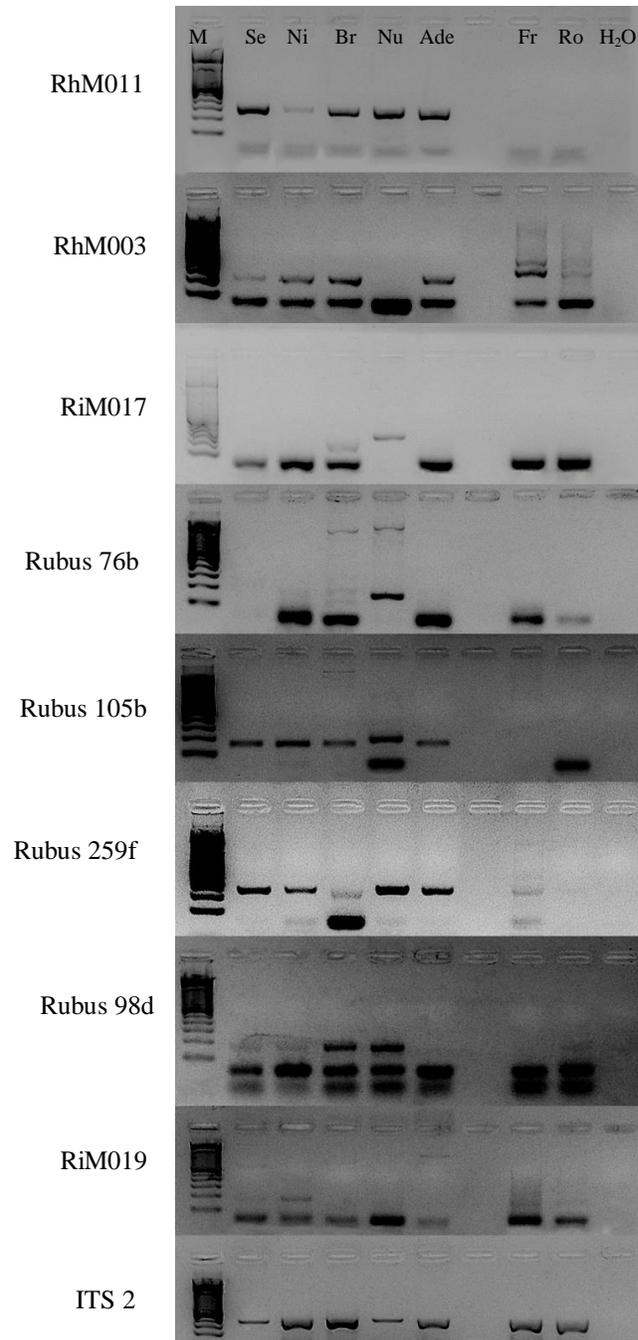


Figura 4.- Gel de agarosa al 1,2% de la reacción de PCR de los 8 “primers” más el control ITS2

Al finalizar la etapa de extracción de ADN de las 7 especies analizadas en el estudio, se las concentro a 50 nanogramos por microlitro (ng/mL) ver anexo 8.4. Después de esto, se amplificaron las muestras mediante el primer ITS 2 con el objetivo de identificar la pureza del ADN, ya que este sirve como código de barras en plantas vasculares. En la figura 7, se presenta el resultado obtenido en los 8 “primers” y el marcador ITS 2 utilizados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la imagen, se presenta el gel de agarosa al 1,2 % junto a su “primer” codificado al lado izquierdo., en el cual RhM011 es el “primer” número 1, RhM003 el “primer” 2, RiM017 el “primer” 3, Rubus 76b el “primer” 4, Rubus 105b el “primer” 5, Rubus 259f el “primer” 6, Rubus 98d el “primer” 7, RiM019 el “primer” 8 y ITS2 representa el “primer” control. Dentro de cada gel se encuentra marcado el marcador (M) el cual representa los pares de bases de 100-1000. Las 5 especies de *Rubus*, más las 2 especies utilizadas como control representadas por sus códigos (ver anexo 8.1). Para la reacción en cadena de la polimerasa, se utilizo agua (H₂O) como control negativo, para tener la certeza de que los componentes de la PCR se encuentren en buenas condiciones y libres de impurezas. Como se puede ver en el resultado, se identificaron 32 alelos en los 8 loci, el número de alelos entre locus varia de 2-6, mediante la figura se puede ver que existe variabilidad genética dentro de las especies analizadas. A pesar de que los microsatélites son marcadores codominantes, se puede observar que la mayoría presenta características dominantes, debido a esto los cálculos realizados para identificar la variabilidad genética se utilizaron como si fueran marcadores codominantes.

Por medio del resultado obtenido mediante la técnica de electroforesis, se visualizaron cada uno de los geles de agarosa, y se observaron los alelos en cada locus y se realizo una matriz binaria de bandas, donde se identifico 1 en presencia y 0 en ausencia (ver anexo 8.5). Con esta matriz binaria se introdujeron los datos en el programa DENDROUPGMA, en el cual las especies forman las filas y los marcadores las columnas.

5.2 Análisis descriptivo de las variables

Tabla 3.-Lista de los 8 microsatélites SSR (Secuencias Simples Repetidas SSR) evaluados en 5 especies de *Rubus* spp. y dos especies de *Rosaceae*. Donde (N) Número de loci total; N_A Número de alelos totales por locus; (H_i) Diversidad génica promedio; (H_o) Heterocigosidad observada; (H_e) Heterocigosidad esperada y (PIC) contenido de información polimórfica

N°	Locus	Secuencia primers (5´-3´)	(N)	N_A	H_i	H_o	H_e	PIC
1	RhM011	F-AAAGACAAGGCGTCCACAAC R-GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	32	2	0.248	0.857	0.789	0.365
2	RhM003	F-CCATCTCCAATTCAGTCTCTCC R-AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC	32	4	0.247	0.535	0.826	0.812
3	RiM017	F-GAAACAGGTGGAAGAAACCTG R-CATTGTGCTTATGATGGTTTCG	32	3	0.253	0.380	0.590	0.572
4	Rubus 76b	F-CTCACCCGAAATGTTCAACC R-GGCTAGGCCGAATGACTACA	32	6	0.221	0.261	0.737	0.709
5	Rubus 105b	F-GAAAATGCAAGGCGAATTGT R-TCCATCACCAACACCACCTA	32	5	0.305	0.285	0.743	0.723
6	Rubus 259f	F-TGGCACAAGAAGCCTGTAAC R-TCCCATATCCCTCAGCATTTC	32	4	0.470	0.464	0.378	0.195
7	Rubus 98d	F-GGCTTCTCAATTTGCTGTGTC R-TGATTTGAAATCGTGC GGTTA	32	3	0.166	0.904	0.789	0.788
8	RiM019	F- ATTCAAGAGCTTAACTGTGGGC R- CAATATGCCATCCACAGAGAAA	32	5	0.342	0.761	0.136	0.954

Los valores de la tabla 3 fueron calculados por medio de las formulas mencionadas en materiales y métodos. En el anexo 8.6 se pueden encontrar cada uno de los cálculos realizados para obtener la frecuencia alelica, la diversidad génica promedio y la heterocigosidad observada y esperada. Por medio de los cálculos, se identificaron a 3 “primers” como los mejores dentro de este estudio, estos “primers” fueron seleccionados debido a su alto porcentaje de heterocigosidad observada, esperada y Contenido de Información polimórfica. Estos resultados son importantes si representan un porcentaje

mayor a 0,5, debido a esto se seleccionaron los “primers” RhM003, Rubus 105b y Rubus 98d.

5.3 Representación de la variabilidad genética mediante un dendrograma.

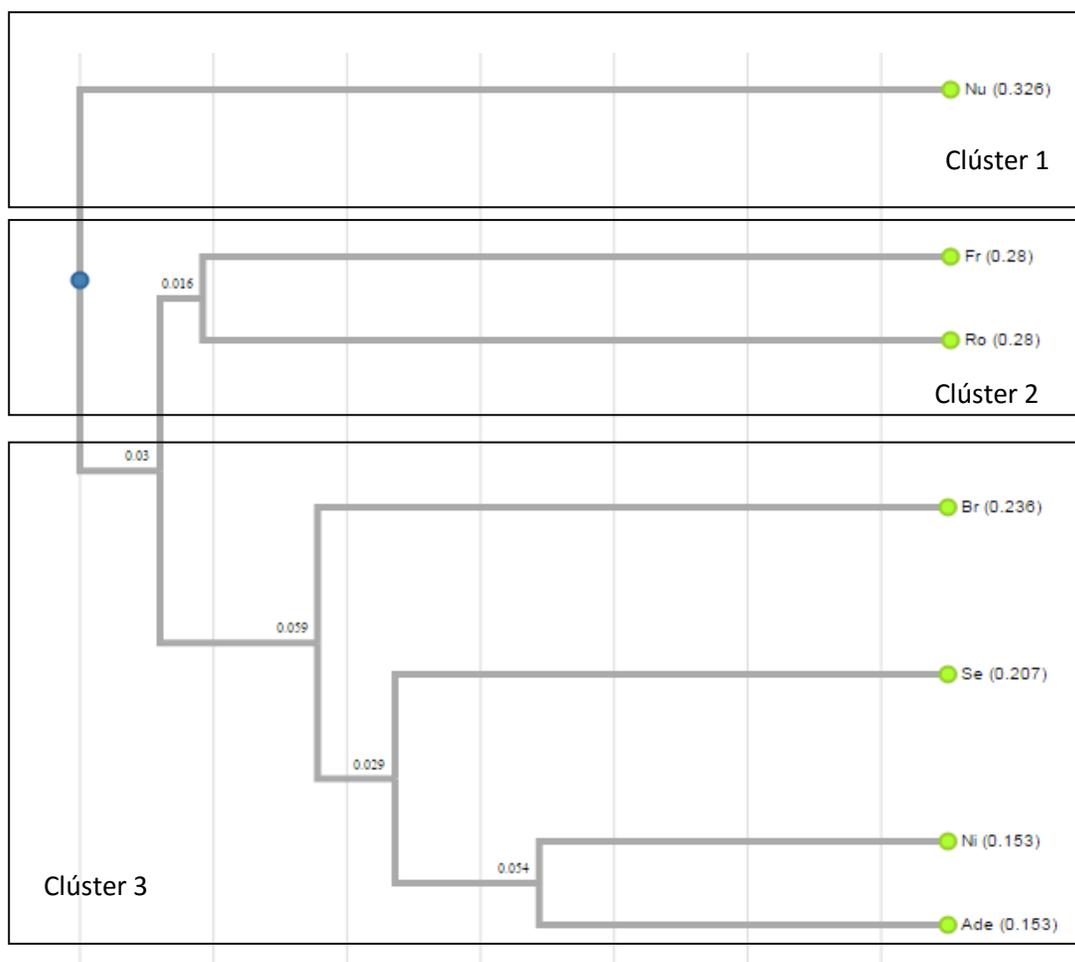


Figura 5.- Dendrograma de los 5 genotipos de *Rubus* spp y controles.

En la figura 5, está representado el dendrograma de los 5 genotipos de *Rubus* más dos controles de la familia *Roseaceae*. En esta figura, se visualizaron 3 clusters principales. En el primer clúster se encuentra la mora silvestre *Rubus nubigenus* (Nu) siendo esta la especie

que presenta mayor diferencia genética. En el segundo clúster se encuentran los dos controles Rosa (Ro) y Frutilla (Fr), en el tercer clúster se encuentran cuatro subgrupos en los cuales se encuentran *Rubus lanciniatus* (Br), *Rubus glaucus* (Se), *Rubus niveus* (Ni) y *Rubus Adenotrichos* (Ade).

5.4 Distancia genética entre las especies utilizadas.

Tabla 4.- Distancia genética entre los genotipos de *Rubus* spp. y controles

	Se	Ni	Br	Nu	Ade	Fr	Ro
Se	0	0.433	0.530	0.586	0.395	0.661	0.559
Ni		0	0.395	0.586	0.306	0.500	0.559
Br			0	0.661	0.433	0.586	0.637
Nu				0	0.559	0.729	0.637
Ade					0	0.530	0.530
Fr						0	0.559
Ro							0

Se considera que la distancia genética entre dos muestras es razonable cuando la distancia entre ellas es mayor a 0.5. Por medio de los 8 “primers” seleccionados se puede ver que existe distancia genética importante entre los siete genotipos utilizados debido a que en su mayoría presentan valores superiores a 0.5 en la mayoría de los genotipos estudiados.

Por medio de la tabla 4, se identifico la distancia genética entre las 5 especies de mora, como se puede observar, la especie que presenta números mayores a 0,5 es *Rubus nubigenus* (Nu), la cual presenta una diferencia de 0,586 por ciento con *Rubus glaucus* (Se), 0,586 por ciento de diferencia con *Rubus niveus* (Ni), 0,661 por ciento de diferencia con *Rubus lanciniatus* (Br) y 0,559 por ciento de diferencia con *Rubus adenotrichos*. Se puede observar tanto en el dendograma como en la tabla 4, que la especie *Rubus nubigenus* es la especie que presenta mayor diversidad genética dentro de este estudio, al encontrarse en un clúster diferente y presentar los valores más altos en cuanto a distancia genética.

VI DISCUSIÓN

Todos los pares de marcadores moleculares microsatélites SSR utilizados en la PCR amplificaron tanto en los 5 genotipos de *Rubus* spp como en los 2 genotipos controles seleccionados dentro de la familia *Rosaceae*, rosa y frutilla.

Los marcadores microsatélites (SSR) son marcadores codominantes, sin embargo pueden presentar dominancia o codominancia. Dentro de los estudios realizados en mora, se han utilizado debido a su alta variabilidad alelica. Por medio de los 8 “primers”, se detectaron un total de 32 loci y 100 alelos. Marulanda, López, y Uribe, 2010, presentaron un número de alelos amplificados entre 1-3, en el estudio realizado por Marulanda y otros, en el año 2012, se presentaron entre 2-6 números de alelos amplificados por locus. En el presente estudio se encontraron entre 2-6 alelos amplificados, debido a esto se espera que exista una amplificación entre 1-6 alelos por marcador molecular.

En base a la distancia genética entre los genotipos existe variabilidad genética significativa en todas las muestras analizadas. Sin embargo, se observó que tanto en el dendograma figura 5, como en distancia genética representada en la tabla 4, *Rubus nubigenus* es la especie de mora que presenta mayor variabilidad genética entre las muestras. Sin embargo entre las otras especies evaluadas no se obtuvo diferencias significativas. Esto es muy común en estudios realizados en mora, ya que según Marluanda las accesiones de *Rubus glaucus* presentan relación con especies silvestres. Todos los porcentajes superan el 0,5 lo que quiere decir que existe una gran variabilidad genética entre esta especie comparada con las demás.

Durante la fase experimental la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, no presentaba amplificación, debido a esto con los componentes se realizaron gradientes de temperaturas, variación en la concentración de reactivos y se llegó a la conclusión que si no existen bandas en ninguna especie en estudio, el ADN es el problema.

Estudios previos, demuestran que para obtener la temperatura de anillamiento en el proceso de PCR es necesario realizar un gradiente a temperaturas diferentes. Marulanda y otros, en el año 2012 presentan temperaturas de annealing similares a las obtenidas dentro de este estudio que varía entre 50 a 60°C dependiendo de cada marcador microsatélite. En el estudio realizado por Castillo y otros en el 2010, se obtuvieron temperaturas dentro del mismo rango, por lo que se considera que no existe mayor diferencia en cuanto al uso de microsatélites SSR entre un laboratorio y otro.

Dentro del presente estudio, se selecciono un primer control en las reacciones en cadena de la polimerasa, como se puede ver en la figura 7 el primer ITS2 sirve como código de barras en plantas vasculares (Gu, y otros, 2013). En el estudio realizado en el 2013 por Gu y otros, se identifico que el marcador ITS 2, presenta un 100% de éxito en cuanto a identificación de especies. A pesar de que el estudio fue en identificación de especies dentro de la familia *Selaginellaceae*, se considera a este marcador como código de barras de plantas vasculares, debido a que el segmento ITS2 se encuentra presente en la mayoría de plantas vasculares. Este control positivo fue de gran ayuda ya que si la muestra de ADN amplifica con este primer quiere decir que el ADN está listo para ser utilizado en otras reacciones.

El rango de heterocigosidad observada vario de 0.2 a 0.9, el rango de heterocigosidad esperada vario de 0.3-0,9 y el contenido de información polimórfica (PIC) vario en un rango de 0.1-0.9. En el estudio realizado en Colombia, se observo el mismo rango de alelos por locus de 2 a 6. Dentro de este estudio, la mayoría de los “primers” utilizados, presentan un intervalo similar en cuanto al contenido de información polimórfica (PIC) de 0.7 a 0.9, con excepción del “primer” 6, Rubus 259f que presenta un porcentaje de 0,195. Se general se obtuvieron porcentajes de PIC desde 0,13 a 0,6, el porcentaje de heterocigosidad esperada fue de 0,11 a 0,57 y porcentajes de heterocigosidad observada desde 0,07 hasta 1. Como se puede comprara en los resultado obtenidos en el presente estudio como el estudio realizado en Colombia, se identificaron porcentajes parecidos en los primers seleccionados (Marulanda, Lopez, y Uribe, 2012), en el estudio realizado en el 2012, se utilizaron 36 primers, de los cuales se seleccionaron 8 para el presente estudio. Los datos obtenidos

representan la diferencia entre "primer", a pesar de tener valores bajos en algunos de los "primer" para heterocigosidad observada, los datos de heterocigosidad esperada (Nei, 1973) fueron altos, como sabemos la heterocigosidad esperada es la probabilidad que dos alelos tomados al azar dentro de una población sean diferentes por lo que tener porcentajes altos de esta variable implica que en condiciones naturales exista polimorfismo.

En el estudio de marcadores microsatélites para frambuesa y mora, realizado por Castillo y otros en el año 2010, se obtuvieron entre 13 microsatélites de SSR los 3 mejores, los cuales fueron RiM019, RhM003 y RhM011. En el estudio realizado por Marulanda, Lopez, y Uribe, en el 2012, se identificaron entre 36 microsatelites utilizados, dos primers como los más polimorficos, los cuales fueorn Rubus 105b y Rubus 107a. En el presente estudio se identificaron como los mejores "primer" a RhM003, Rubís 105b y Rubís 98d, debido a que presentaron los valores más altos tanto en heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada y contenido de información polimórfica, siendo el primer 2, RhM003, el mejor de todos presentando un porcentaje de 0.535 de heterocigosidad observada, un porcentaje de 0.826 de heterocigosidad esperada y un porcentaje de 0.812 de contenido de información polimórfica. Con esta información se pueden seleccionar estos primers para futuros análisis genéticos en *Rubus*, ya que dentro de estudios previos analizados, se han obtenido valores estadísticos similares.

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- Debido a que el ADN es el paso fundamental en estudios de caracterización molecular, se al realizar una correcta extracción de ADN se pudo obtener concentraciones de ADN elevadas, las cuales se homogenizaron a 50ng para la correcta realización de PCR.
- Se obtuvo una concentración de coctel PCR total de 12,5 uL.
- Por medio del Primer control ITS2 se comprobó la calidad del ADN, debido a que este fragmento se encuentra presente en la mayoría de plantas vasculares y debería amplificarse en la PCR.
- Colocando la matriz binaria en el programa DENDROPUGMA se identificaron las distancias genéticas entre los genotipos estudiados y se obtuvieron 3 clusters principales en los cuales se encuentra *Rubus nubigenus* en el primer cluster, seguido por los controles frutilla y rosa y el ultimo clúster se encuentra dividido por 4 subgrupos, los cuales son *Rubus lanciniatus*, *Rubus galucus*, *Rubus niveus* y *Rubus adenotrichos*.
- Las distancias entre individuos tuvieron porcentajes significativos, mayores a 0,5 por lo que existe polimorfismo dentro de la población.
- Se determino que la especie *Rubus nubigenus* presenta un grado de diferencia de 0,586 con *Rubus glaucus* y *Rubus Niveus*, 0,661 con *Rubus lanciniatus* y 0,559 con *Rubus adenotrichos*.
- Se determino que el mejor marcador molecular fue el primer 2 RhM003 ya que presento el mayor porcentaje de PIC (0,812).

7.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar el género *Rubus* con mayor número de primers para obtener datos más confiables del porcentaje de variabilidad genética entre las especies utilizadas dentro de este estudio.
- Utilizar mayor número de muestras, dentro del género *Rubus*, para sustentar los porcentajes obtenidos tanto en heterocigosidad observada y esperada, como en contenido de información polimórfica.
- Utilizar gel de poliacrilamida para visualizar e identificar de mejor manera el tamaño de las bandas presentes.

VIII ANEXOS

8.1 Nomenclatura de las muestras en estudio

Tabla 5.-Nomenclatura del material experimental

N° muestra	Especie	Nomenclatura
1	Iniap Andimora (<i>Rubus glaucus</i>)	Se
2	<i>Rubus niveus</i>	Ni
3	Brazos (<i>Rubus lanciniatus</i>)	Br
4	<i>Rubus nubigenus</i>	Nu
5	<i>Rubus adenotrichos</i>	Ade
6	(<i>Fregaria x ananassa</i>) var. Albión	Fr
7	<i>Rosa</i> sp var. "Freedom"	Ro

8.2 Componentes del BE (Buffer de Extracción)

Tabla 6.- Componentes del Buffer de Extracción (BE) método CTAB

Reactivo	Concentración (%)	Volumen 250mL
CTAB	2%	5gr
NaCl	1,4M	81,8gr o 70ml de NaCl 5 M
EDTA	20mM	10ml 0,5M EDTA
Tris-HCl (pH=8)	100mM	100ml 1M Tris-HCl
β- Mercaptoetanol	0,2%	0,5ml

8.3 Preparación del TAE 10X

- Tris Ultra Puro: 48,4 gramos
- Ácido Acético Glacial: 11,42 ml
- EDTA 0,5M pH=8: 20ml

Mezclar todos los componentes y aforar a 1000 ml y ajustar el pH a 8,2-8,3 (con ácido acético o EDTA)

- Para preparar TAE 1X, se debe diluir 100 ml de TAE 10X en 1000 ml de agua destilada.

8.4 Fotografía de ADN de los 5 genotipos de mora y los 2 controles a 50ng/mL

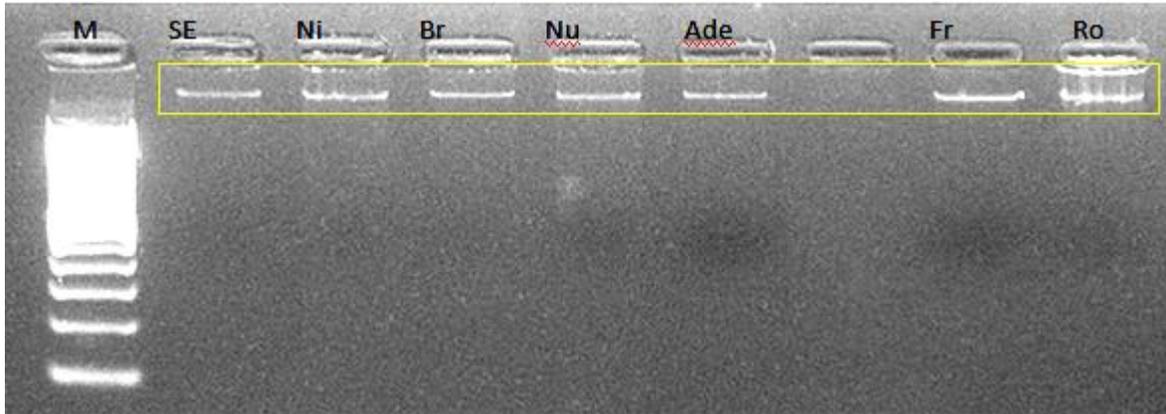


Figura 6.- Gel de agarosa al 1,2% de las muestras del estudio a 50ng/mL.

8.5 Matriz Binaria

Tabla 7.- Matriz binaria en base a los resultados de PCR

	Primer 1		Primer 2				Primer 3			Primer 4						Primer 5					Primer 6				Primer 7			Primer 8	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29
Se	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
Ni	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
Br	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
Nu	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
Ade	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
Fr	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
Ro	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0

8.6 Cálculo de la diversidad Genética de un marcador dominante

Tabla 8.-Cálculo de la diversidad genética del primer 1 RhM011

Primer	Locus	Análisis de Datos				Frecuencia Alelica		$h_j = (1-p^2-q^2)$	Hi
RhM011	A	Genotipos	AA	Aa	aa	Total	p	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	5		2	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p1= 0.71$		$p2= 0.29$	1			
	B	Genotipos	BB	Bb	bb	Total	p	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	7		0	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p1=1$		$p2= -$	1			

Tabla 9.-Cálculo de la diversidad genética del primer 2 RhM003

Primer	Locus	Análisis de Datos				Frecuencia Alelica		$h_j = (1-p^2-q^2)$	Hi
RhM003	A	Genotipos	AA	Aa	Aa	Total	p	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	2		5	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p1= 0.29$		$p2= 0.71$	1			
	B	Genotipos	BB	Bb	bb	Total	p	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	2		5	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p1=0.29$		$p2= 0.71$	1			
	C	Genotipos	CC	Cc	cc	Total	p	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	4		6	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p1= 0.57$		$p2= 0.43$	1			
	D	Genotipos	DD	Dd	Dd	Total	p	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	7		0	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p1=1$		$p2= -$	1			

Tabla 10.-Cálculo de la diversidad genética del primer 3 RhM017

Primer	locus	Análisis de Datos				Frecuencia Alelica		$h_j = (1 - p^2 - q^2)$	Hi
RhM017	A	Genotipos	AA	Aa	Aa	Total	P	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	P^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	1		6	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.14$		$p_2 = 0.86$	1	0.08	0.92	0.147
	B	Genotipos	BB	Bb	Bb	Total	P	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	P^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	1		6	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.14$		$p_2 = 0.86$	1	0.08	0.94	0.147
	C	Genotipos	CC	Cc	cc	Total	P	q	
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	6		1	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.86$		$p_2 = 0.14$	1	0.63	0.37	0.466

Tabla 15.-Cálculo de la diversidad genética del primer 8 RiM019

Primer	locus	Análisis de Datos				Frecuencia Alelica		$h_j = (1 - p^2 - q^2)$	Hi
RiM019	A	Genotipos	AA	Aa	Aa	Total	P	q	0.147
		Frecuencia genotípica (esp.)	P^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	1		6	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.14$		$p_2 = 0.86$	1			
	B	Genotipos	BB	Bb	Bb	Total	P	q	0.147
		Frecuencia genotípica (esp.)	P^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	1		6	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.29$		$p_2 = 0.71$	1			
	C	Genotipos	CC	Cc	Cc	Total	p	q	0.147
		Frecuencia genotípica (esp.)	p^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	1		6	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.14$		$p_2 = 0.86$	1			
	D	Genotipos	DD	Dd	Dd	Total	P	q	0.268
		Frecuencia genotípica (esp.)	P^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	2		5	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 0.29$		$p_2 = 0.71$	1			
	E	Genotipos	EE	Ee	Ee	Total	P	q	-
		Frecuencia genotípica (esp.)	P^2	$2pq$	q^2	1			
		Individuos (N°)	7		0	7			
		Frecuencia genotípica (obs.)	$p_1 = 1$		$p_2 = -$	1			

IX LITERATURA CITADA

- Alexander, P., Bahret, M., Chaves, J., Courts, G., & D'Álessio, N. (1992). El código genético. En *Biología* (pp. 75-77). New Jersey: Prentice Hall.
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas: Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* , 17(2): 2-15. , 221-242. , 223.
- BIO BASIC INC. (2015). *Probiotek*. Recuperado el 25 de Octubre de 2015, de <http://www.probiotek.com/producto/ctab/>
- BioResource. (2014). *Ethanol Precipitation of DNA - Principle and Methods*. Recuperado el 12 de Marzo de 2016, de Technology in Science: http://technologyinscience.blogspot.com/2014/02/ethanol-precipitation-of-dna-principle.html#.V4O9Q_nhDIW
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., & Davis, R. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* , 319-323.
- Brown, T. (2007). Marcadores de ADN para mapeo genético. En *Genomas 3ra edición* (pp. 71-72). Madrid: Panamericana.
- Cancino, G., Sánchez, L., Quevedo, E., & Díaz, C. (2011). Determinación de especies del género *Rubus*. *Universitas Scientiarum* , 220-223.
- Castillo, A. (2008). *Invasive Species in the Galapagos Islands Goats and blueberries (Mora)*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2014, de http://eebweb.arizona.edu/courses/galapagos/Expert%20Topics%202008/Invasive%20Species_Aida.pdf
- Castillo, M. (2014). Extracción de ADN. En *Laboratorio de biología molecular* (pp. 5-6., 8). Iztapalapa: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.

- Castillo, N., Reed, B., Graham, J., Fernández, F., & Bassil, N. (2010). Microsatellite Markers for Raspberry and Blackberry. *American Society for Horticultural Science* , 276-277.
- Cavalli-Sforza, L., & Bodmer, W. (1891). En *Genética de las Poblaciones Humanas*. Barcelona: Omega.
- Concejo Metropolitano de Quito. (2012). Resolución No.C 238. (pág. 2). Quito: Concejo Metropolitano de Quito.
- de Dios, T., & Velasquillo, I. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud* , 1-9.
- Delgado, F. (2012). Variedades. En *Manejo orgánico del cultivo de mora (Rubus sp.)* (pp. 27-29). Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Diana Duarte-Delgado, M. I. (2011). Evaluación preliminar de la huella genómica de genotipos élite de *Rubus glaucus* Benth. con marcadores AFLP. *PLANT BREEDING, GENETIC RESOURCES & MOLECULAR BIOLOGY* , 1-14.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2007). Principios generales de microbiología clínica. En *Diagnóstico Microbiológico* (pp. 136-138). Texas: Panamericana.
- Franco, T., & Hidalgo, R. (2003). Parámetros de diferenciación entre poblaciones. En *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos* (pp. 82). Roma: IPGRI.
- González, E. (2003). Microsatélites: Sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* , 1-12.
- González, N., & Zavala, J. (2005). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En J. Zavala, *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular* (pp. 117-120). Yucatán: Universidad Autónoma de Yucatán.

- Graham, J., & Woodhead, M. (2009). Raspberries and Blackberries: The Genomics of *Rubus*. En *Genetics and Genomics of Rosaceae* (pp. 507-508). Nueva York: Springer.
- Gronau, I., & Moran, S. (2007). Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms. *Information Processing Letters* , 1-6.
- Gu, W., Song, J., Cao, Y., sun, Q., yao, H., Wu, Q., y otros. (2013). Application of the ITS2 Region for Barcoding Medicinal Plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PlosOne* , 4-8.
- Henry, R. (2001). Plant DNA Extraction. En *Plant Genotyping, The DNA Fingerprinting of Plants* (pp. 239-243). Lismore: CABI.
- Hinrichsen, P., Muñoz, C., Narváez, C., & Valenzuela, J. (2000). Comparación de RAPD y AFLP como método de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. *Agricultura Técnica* , 1-4.
- Laboratorio de Biotecnología Agrícola, (2015). *Extracción de ADN método CTAB*. Cumbaya: USFQ.
- Landázuri, O. (2010). La ‘mora’ *Rubus niveus* algunos datos importantes sobre la especie en el contexto de la problemática de control y erradicación de la especie. *La Granja* , 29-30.
- León, J. (1987). Mora de Castilla, *Rubus glaucus*. En *Botánica de los Cultivos Tropicales* (pp. 301). San José: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura.
- Lörz, H., & Wenzel, G. (2008). Microsatellites. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 55 Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement* (pp. 25). Berlin: Springer.
- Martínez, A. (2014). *INIAP*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2014, de Iniap Investiga en mora sin espinas:

http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=818:iniap-investiga-en-mora-sin-espinas&catid=97&Itemid=208

- Martínez, A. (2007). *Manual del Cultivo de la Mora de Castilla*. Ambato: INIAP-UTA.
- Marulanda, M., López, A., & Uribe, M. (2010). Genetic Diversity and Transferability of *Rubus* Microsatellite Markers to South American *Rubus* Species. En *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity* (pp. 151-162). InTech.
- Marulanda, M., Lopez, M., & Uribe, M. (2012). Molecular characterization of the Andean blackberry, *Rubus glaucus*, using SSR markers. *Genetics and molecular research* , 155-157.
- Muñoz, J. C., & Coronado, Y. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudio de diversidad genética vegetal. *Universidad Nacional de Colombia* , 5.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity subdivided populations. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America* , 3321-3323.
- Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J., & Clària, J. (2004). Electroforesis de ácidos nucleicos. En *Genética médica* (pp. 65-66. , 67). Barcelona: i Edicions.
- Ornelas, J., Yahia, E., Ramírez, N., Pérez, J., Escalante, M., Ibarra, V., y otros. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa Duch*, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry* , 372-381.
- Orozco, E. (2008). Su estructura y su organización. En *Así estamos hechos. ¿cómo somos? De la lectura del genoma a la clonación humana*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Othaix, A. (2012). Utilización de isoenzimas como marcadores moleculares en el estudio de variabilidad de frutos nativos. *Universidad de la Republica (Uruguay)* , 11-13.

- Passarge, E. (2009). Amplificación de DNA por reacción. En *Genética Texto y Atlas 3ra edición* (pp. 60). Essen: Panamericana.
- Pérez, A. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Recuperado el 19 de Abril de 2015, de Universidad Politécnica de Valencia.: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%F3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf?sequence=1>
- Pérez, J., & Cornejo, M. (2014). Marcadores genéticos. En *Cómo y por qué trabajamos con células vegetales* (pp. 116). Valencia: Universidad de Valencia.
- Perkins-Veazie, P. (2015). *USDA*. Recuperado el 8 de Marzo de 2016, de Blackberry: <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/blackberry.pdf>
- Phillips, W., Rodríguez, H., & Fritz, P. (1995). Marcadores moleculares. En *Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo* (pp. 33). Turrialba: Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE).
- Proecuador. (2013). *Análisis sectorial de flores*. Recuperado el 1 de Octubre de 2014, de Proecuador: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC_AS2013_FLORES.pdf
- Puerta, C., & Ureña, C. (2005). Estimación de la Concentración de ADN. En *Prácticas de Biología Molecular* (pp. 22). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Puerta, C., & Ureña, C. (2005). Extracción del ADN. En *Prácticas de biología molecular* (pp. 15-16). Pontificia Universidad Javeriana.
- Rentaría, M. (n.f). *INECC*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2014, de Breve Revisión de los marcadores moleculares: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap18.pdf>

- Rocha, P. (2002). Aislamiento del ADN. En *Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite* (pp. 12-13). Bogotá.
- Romoleroux, K. (1988). Diversidad de las moras (*Rubus* spp.) en el Ecuador: Un recurso fitogenético poco explorado. *II Reunión Nacional sobre Recursos Fitogenéticos* , 163.
- Romoleroux, K. (1996). Rosaceae. En *Flora of Ecuador* (pp. 21-23. , 27-28. , 31-32. , 39-40). Göteborg: University of Göteborg.
- Somma, M. (2007). Extracción y Purificación de ADN. En *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos* (pp. 6-9). Luxemburgo: Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa.
- Tamara, L; & Vallejo, I . (2009). *CORPEI*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2014, de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>
- Tanksley, D., Medina, H., & Rick, C. (1981). The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato basis of an early screening procedure. *Theoretical and Applied Genetics* , 291-292.
- Tanksley, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* , 3-8.
- University, I. y. (2004). Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje. *Medidas de diversidad* , 1-12.
- UNMP. (2011). *Introducción a la Biotecnología, Trabajo Práctico N°1: Extracción y purificación de ADN de tejidos vegetales*. Recuperado el 25 de Junio de 2015, de http://www.mdp.edu.ar/agrarias/grado/741_Intr_Biotecnologia/archivos/TP1_Extraccion_ADN_Vegetal.pdf

- Whealy, K. (2001). Blackberry. En *Fruit, Berry and Nut Inventory, 3th edition* (pp. 328). Iowa: Seed Savers Exchange, Inc.
- Zabatela, M. Y. (2008). Comparación de dos kits de RT-PCR en la detección de ARNm de dos genes endógenos de papa (*Solanum tuberosum* spp. Andígena) . *Revista Colombiana de Biotecnología* , 4.
- Zavala, J. (2009). Comentarios generales. En *Manual de Técnicas básicas de Biología Molecular* (pp. 29-33). Yucatán: Universidad Autónoma de Yucatán.