

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio preliminar de la diversidad genética de la mora, *Rubus niveus* Thunb., en cuatro islas del archipiélago de Galápagos mediante marcadores moleculares microsatélites

Pablo Ismael Alarcón Bolaños

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Estudio preliminar de la diversidad genética de la mora, *Rubus niveus*
Thunb., en cuatro islas del archipiélago de Galápagos mediante
marcadores moleculares microsatélites**

Pablo Ismael Alarcón Bolaños

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Gabriela Pozo Andrade, MSc

Quito, 21 de diciembre de 2020

© 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Pablo Ismael Alarcón Bolaños

Código: 00136791

Cédula de identidad: 1718944687

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Rubus niveus es una de las especies invasoras que más ha afectado a las Islas Galápagos. Las características principales que han permitido su expansión por estas islas son su adaptabilidad a nuevos entornos, cobertura continua del suelo, fácil dispersión de semillas y posiblemente, su diversidad genética. Determinar su variabilidad genética podría contribuir a su control. Por tanto, el objetivo de este estudio fue realizar un análisis preliminar de la diversidad genética de 68 individuos de *R. niveus*, de las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana usando 15 marcadores moleculares microsatélites (SSR). Los electroferogramas de cada uno de los 15 locus revelaron alelos monomórficos por lo que no se pudo determinar los índices de diversidad genética en las muestras analizadas. Adicionalmente, se realizó la técnica High-Resolution Melting (HRM) para identificar diferencias en la secuencia de alelos de un mismo tamaño, sin embargo, el resultado no fue concluyente. El siguiente paso es explorar nuevos marcadores moleculares para determinar el nivel de diversidad genética de *Rubus niveus* y así aportar para el manejo de esta especie invasora en las Islas Galápagos.

Palabras clave: *Rubus niveus*, especie invasora, Galápagos, diversidad genética, SSR, alelos monomórficos, High-Resolution Melting

ABSTRACT

Rubus niveus is an invasive species that has had a negative impact on the Galapagos Islands. The main characteristics that have allowed this species' expansion on these islands is its adaptability to new environments, continuous ground coverage, widespread seed dispersal and possibly its genetic diversity. Determining *Rubus niveus* genetic variability could help manage this invasive plant. The objective of this study was to carry out a preliminary analysis of the genetic diversity of 68 individuals of *R. niveus*, from Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela and Floreana islands using 15 microsatellite molecular markers (SSR). The electropherograms of each of the 15 loci revealed monomorphic alleles, so it was not possible to determine genetic diversity statistics for the analyzed samples. Additionally, a High-Resolution Melting (HRM) technique was performed to identify differences in allele sequences of the same size, however, the result was not conclusive. The next step is exploring new molecular markers to determine the level of genetic diversity of *Rubus niveus* and thus contribute to the management of this invasive species on the Galapagos Islands.

Keywords: *Rubus niveus*, invasive species, Galapagos, genetic diversity, SSRs, monomorphic alleles, High-Resolution Melting

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	10
1.1	Información general de la especie	10
1.2	Galápagos y <i>Rubus niveus</i> : introducción, dispersión, impacto en la agricultura, implicación ecológica y métodos de control	10
1.3	Diversidad genética	12
2	METODOLOGÍA	15
2.1	Recolección de muestras	15
2.2	Extracción de ADN, electroforesis y cuantificación.....	16
2.3	Elección de loci SSR	16
2.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis	17
2.5	Genotipado	17
2.6	High-Resolution Melting (HRM)	18
3	RESULTADOS	20
3.1	Extracción y cuantificación de las muestras de <i>R. niveus</i>	20
3.2	Amplificación de primers SSR	20
3.3	Análisis de electroferogramas	20
3.4	High-Resolution Melting (HRM)	21
4	DISCUSIÓN.....	22
4.1	Concentración, calidad del ADN y amplificación	22
4.2	Evaluación del monomorfismo de loci SSR en <i>R. niveus</i>	23
4.3	Homoplasia molecular y High-Resolution Melting	24
4.4	Recomendaciones para futuras investigaciones	25
5	CONCLUSIONES	27
6	TABLAS	28
7	FIGURAS	30
8	BIBLIOGRAFÍA	35
9	ANEXOS	44
	Anexo 1: Muestras de <i>R. niveus</i> y sus sitios de recolección en Galápagos.	44
	Anexo 2: Mapa de los sitios de muestreo en las islas Galápagos realizado en ArcMap 10.5.	45
	Anexo 3: Mapa de los sitios de muestreo en Ecuador continental realizado en ArcMap 10.5.	47
	Anexo 4: Amplificación de regiones ITS en <i>R. niveus</i>	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información general de los loci.	28
Tabla 2. Condiciones de la estandarización con fluoróforo.	28
Tabla 3. Tamaño amplificado de los SSR.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.	30
Figura 2. Amplificación de los 15 loci heterólogos en <i>R. niveus</i>	31
Figura 3. Electroferogramas de muestras aleatorias de Galápagos.	32
Figura 4. Electroferogramas de los 15 SSR.	33
Figura 5. Curvas de fluorescencia del análisis High-Resolution Melting.	34

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Información general de la especie

Rubus niveus (Thunb.), conocida en el Ecuador como “mora”, es un arbusto perenne originario de Asia, específicamente de las zonas templadas del sistema de los Himalayas (Quinton *et al.* 2011), desde donde se ha dispersado a lo largo de los continentes principalmente por acciones antropogénicas (CABI, 2019). Su fruto posee un sabor agradable, un alto contenido nutricional (Caidan *et al.*, 2013) y metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Ahmad *et al.*, 2015).

Se la observa en bordes de carreteras, campos abiertos, bosques no perturbados (BIISC, 2003) y áreas urbanas (Starr, Starr & Loope, 2003). Sus semillas son muy viables y tiene un desarrollo rápido (Jäger, 2018). En su etapa adulta, sus tallos se entrelazan entre sí, formando un matorral alto, espinoso y denso que obstruye el paso de animales grandes (GISD, 2020; PIER, 2012). Además, cubre los suelos continuamente impidiendo la regeneración de árboles o arbustos nativos y de uso económico (Jäger, 2018). Por ello, la mora es un gran problema en archipiélagos (CABI, 2019) tales como Hawái y Galápagos, donde es considerada una maleza nociva (Quinton *et al.* 2011).

1.2 Galápagos y *Rubus niveus*: introducción, dispersión, impacto en la agricultura, implicación ecológica y métodos de control

Galápagos presenta un alto grado de endemismo en todos los grupos taxonómicos (Valle, 2013). Además, posee especies introducidas. Éstas se convierten en invasoras perturbando las interacciones entre especies del ecosistema insular (Rentería *et al.*, 2012a). En especial, Galápagos es vulnerable a plantas invasoras por su clima variado, su tipo de suelo y sus distintos rangos altitudinales (Moity & Rivas, 2018). Una de las

especies invasoras es *R. niveus* (Laweson & Ortiz, 1994) ubicándose en la zona húmeda-alta de las islas San Cristóbal, Santa Cruz, Floreana e Isabela (Quinton *et al.* 2011). Esta no es la única invasora del género *Rubus* en Galápagos, pero es la que más afecta a la vegetación nativa, pues es la que más plantas ha desplazado (Jäger, 2018).

Hay varias propuestas acerca de su introducción, lo que sugiere más de un evento introductorio. Según Jäger (2018), este evento sucedió en 1968 en Santa Cruz. El Parque Nacional Galápagos (PNG) (s.f.) sugiere que fue entre 1975-1978. Por otra parte, Laweson & Ortiz (1994) y Quinton *et al.* (2011), plantean que fue alrededor de 1983 en San Cristóbal. A pesar de no estar de acuerdo en el lugar y la fecha de introducción, estos autores destacan que su amplia cobertura en Galápagos ha sido posible por su propagación vegetativa y por la fácil dispersión de sus semillas; éstas pueden dispersarse por la acción de mamíferos, reptiles y aves, pues su fruto es parte de sus dietas (Laso *et al.*, 2020). Aves insectívoras (Buddenhagen & Jewell, 2006) y aves no depredadoras de semillas (que no rompen la semilla al comer el fruto) propagan a *R. niveus* de manera intra insular, liberando las semillas en sus heces (Guerrero & Tye, 2011). Algunos ejemplos son el papamoscas de Galápagos (*Myiarchus magnirostris*) y el sinsonte de San Cristóbal (*Mimus melanotis*) (Heleno *et al.*, 2013).

Los suelos de la zona agrícola, al ser ricos en nutrientes (Laso *et al.*, 2020), son cubiertos continuamente por la mora, afectando los cultivos de la zona (Jäger, 2018). Por otra parte, en el Parque Nacional Galápagos ha desplazado plantas nativas como *Miconia robinsoniana*, *Cyathea weatherbyana* y *Scalesia pedunculata* (Jäger, 2018; Quinton *et al.* 2011). En el bosque de *Scalesia*, compite por recursos y sus matorrales reducen el paso de luz. Además, *S. pedunculata* es de vida corta y tiene eventos de regeneración antecedidos de muertes masivas, lo que genera nichos libres que pueden ser ocupados

gracias a la rápida propagación de la mora (Rentería *et al.*, 2012a). Heleno *et al.* (2013), sugieren que su rápida propagación es debido a las épocas de escasez de frutos de plantas nativas, que permiten la dispersión de *R. niveus* por dispersores de frutos carnosos.

Por los motivos anteriormente expuestos, se ha tratado de mantener la cobertura de la mora por debajo del 60% (Jäger, 2015). El control es manual (PNG, s.f.) y químico (Cimadom *et al.*, 2019). En Floreana, se extrae las plántulas a mano y se usa herbicida en plantas adultas (Malanson & Walsh, 2013). El costo oscila entre los \$500-2.000 /ha, y no es eficaz a largo plazo (Jäger, 2018). Además, el control químico afecta a las aves al reducir la densidad de artrópodos, que constituyen su alimento (Cimadom *et al.*, 2019). Según la Fundación Charles Darwin (s.f.), se ha visto que tratar con picloram a la especie invasora *Cinchona pubescens* ha facilitado el establecimiento de *R. niveus*. Posiblemente por su capacidad de “invadir comunidades seminaturales perturbadas” (Richardson *et al.*, 2000). Es así que los controles han sido ineficientes, y se requieren más estudios para plantear alternativas, por ejemplo, un control biológico (Rentería *et al.*, 2012b).

1.3 Diversidad genética

El nivel de diversidad genética de una especie invasora puede servir para explicar su éxito ecológico, establecer un control biológico y restaurar los taxones vegetales nativos (Prentis *et al.*, 2012; Rentería *et al.*, 2012b). Según Bossdorf *et al.* (2005), las invasiones a nuevos entornos implican la interacción con nuevos factores biológicos y ambientales que generan nuevas presiones selectivas sobre los genotipos de una población, regulando así su variabilidad genética. A su vez, estas nuevas presiones selectivas pueden causar cambios evolutivos adaptativos que podrían explicar su éxito ecológico. En eucariotas ya se ha reportado que el éxito de especies invasoras puede darse por su diversidad genética (Tsutsui *et al.*, 2020).

Debido a la utilidad de los estudios de diversidad genética, uno de los campos de estudio del Parque Nacional Galápagos ha sido la ecología de poblaciones (De la Torre, 2013). En estas investigaciones se utilizan marcadores moleculares: secuencias de ADN que permiten un monitoreo de la herencia y son fácilmente identificables (Mishra *et al.*, 2014). El marcador se escoge de acuerdo al objetivo del estudio, los recursos del equipo de trabajo y por su capacidad de detectar polimorfismos comparando un grupo de individuos y así determinar su diversidad genética (Kumar *et al.*, 2009; Lemos *et al.*, 2020). Existen marcadores basados en PCR, siendo uno de los más utilizados las secuencias repetidas cortas (SSR) o microsatélites, por su herencia codominante y alto polimorfismo (Kumar *et al.*, 2009). Éstos constan de repeticiones de 1-4 nucleótidos conocidas como motivos, y el tamaño de cada alelo es el resultado del número de repeticiones en tándem del motivo (Mishra *et al.*, 2014). Son abundantes en eucariotas y por su naturaleza repetitiva y replicación enzimática propensa a errores, generan alelos de diferentes tamaños en un mismo locus heredado (Iwasa & Marshall, 2018). Finalmente, no son muy costosos, por lo que se usan en gran variedad de especies vegetales que necesitan ser estudiadas por su importancia ecológica (Lörz & Wenzel, 2005).

Para *R. niveus* no se han desarrollado primers específicos, pero sí se reportan para especies emparentadas. Según Foster *et al.* (2019) se tiene primers para *R. idaeus*, *R. glaucus*, *R. alceifolius*. *Rubus* L. subgenus *Rubus* (híbrido Marionberry), entre otros. Exceptuando *R. alceifolius*, que es una planta invasora de la isla Reunión (Amsellem *et al.*, 2001), las demás son de interés agrícola. Marulanda *et al.* (2012a) y Marulanda *et al.* (2012b) indican que los SSRs desarrollados para las especies mencionadas son heterólogos y por eso pueden usarse en otras especies de este género. Esto se debe a que las regiones flanqueantes son altamente conservadas en la categoría de especie e incluso

en grupos taxonómicos más amplios (NCBI, s.f.). Cabe mencionar que la amplificación de estos SSRs fue probada en diferentes especies de *Rubus* en la tesis de pregrado de Álvarez (2016), obteniendo resultados satisfactorios de la amplificación.

Los análisis de diversidad genética usan ampliamente SSRs por la transferibilidad de estos marcadores cuando las especies son filogenéticamente relacionadas (Zhang *et al.*, 2019). Adicionalmente, a los primers se les puede añadir fluoróforos para facilitar el genotipado y la determinación de alelos (NCBI, s.f.; Mishra *et al.*, 2014). Una opción es la metodología de Blacket *et al.* (2012). Ésta utiliza un primer reverse, un primer forward modificado, el cual está unido a una secuencia universal corta en su extremo 5', y un tercer primer marcado con uno de 4 fluoróforos y su secuencia es complementaria a la secuencia corta adicional del primer forward. En la PCR, el primer forward modificado añade la secuencia corta a los primeros amplicones hasta que se agota en los primeros ciclos pues está en menor concentración. Es ahí cuando el tercer primer se une por complementariedad a la secuencia universal corta, generando amplicones marcados que podrán ser genotipados por fluorescencia.

Por lo expuesto, el objetivo de este estudio fue realizar un análisis preliminar de la diversidad genética de *R. niveus*, encontrado en las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana mediante el uso de 15 SSR heterólogos. Esta información junto con otros estudios podría apoyar a establecer un control biológico efectivo de la mora en las Islas Galápagos.

2 METODOLOGÍA

2.1 Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de 68 plantas de *R. niveus* en las islas Galápagos entre marzo y junio de 2019. Alrededor de 5 hojas jóvenes fueron colectadas de cada individuo, y se las identificó con un número y un código de 3 letras que indica la isla a la que pertenecen. De las 68 muestras, 18 son de San Cristóbal (SCR), 18 de Santa Cruz (STX), 18 de Isabela (ISA) y 14 de Floreana (FLO), la mayoría al borde de carreteras (Anexo 1). Todas las muestras se almacenaron en una funda ziploc con gel de sílice. Luego se las movilizó al Galapagos Science Center en San Cristóbal y se las mantuvo a temperatura ambiente. Posteriormente, se las trasladó al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ en Quito, Ecuador.

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con las muestras de Galápagos, se analizaron también 10 muestras del Ecuador continental, las cuales fueron colectadas entre junio y octubre del 2018. Asimismo, alrededor de 5 hojas de cada individuo fueron colectadas cerca de carreteras. Se utilizó una muestra de la avenida Intervalles (INT), una de Cumbayá (CUM), dos del Valle de los Chillos (VCH), dos de Puenbo (PUE), dos de Mindo (MIN) y dos de Riobamba (RIO). De igual forma, se almacenó las hojas en una funda ziploc con gel de sílice y se las trasladó al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Según las coordenadas geográficas de donde fueron colectadas (Anexo 1), se ubicó las muestras en mapas de cada isla (Anexo 2) y en un mapa del continente (Anexo 3). Los mapas fueron realizados en el programa ArcMap 10.5.

2.2 Extracción de ADN, electroforesis y cuantificación

Se extrajo ADN de las hojas mediante el protocolo de CTAB (Murray & Thompson, 1980). La integridad de ADN genómico se observó en un gel de agarosa al 1% (p/p) teñido con SYBR Safe (Invitrogen). El gel fue revelado mediante el software Image LabTM del sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (Figura 1). Se cuantificó el ADN extraído mediante el uso del espectrofotómetro de UV visible Nanodrop 2000TM de Thermo ScientificTM. Luego de la cuantificación, se diluyeron las muestras en TE 1X para trabajar con concentraciones de ADN de aproximadamente 20 ng/ul en la mezcla de reacción de PCR.

2.3 Elección de loci SSR

Se utilizaron 15 primers SSR del género *Rubus*, diseñados para las especies *Rubus idaeus*, *Rubus Glaucus*, *Rubus alceifolius* y del híbrido Marion blackberry. Once SSRs se tomaron de Marulanda *et al.* (2012a) y Marulanda *et al.* (2012b): Rubus116a, Rg-A12-1, RhM003, Rubus16a, Rubus76b, RhM011, mRaCIRRIH3, Rubus98d, Rubus259f, RhM021 y Rubus105b. Tres SSRs se tomaron de Graham *et al.* (2004): Rubleaf97, Rubus126b y Rubus275a. Finalmente, se tomó el microsatélite RiM019 de Castillo *et al.* (2010). Todos los SSRs fueron escogidos en base al alto polimorfismo y a la transferibilidad reportada en las especies de *Rubus* mencionadas. Además, para la elección de los loci también se tomó en cuenta el proyecto de tesis de Álvarez (2016) pues tuvo una amplificación exitosa de los loci RhM003, Rubus76b, RiM019, RhM011, Rubus98d, Rubus259f y Rubus105b en la especie *Rubus niveus*. Con el fin de facilitar el trabajo en laboratorio, se renombró los 15 loci SSR con un código de tres caracteres (R01-R15). El detalle de los loci se indica en la Tabla 1.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

Para comprobar la calidad del ADN, se amplificó el segundo espaciador transcrito interno (ITS2) con los primers universales (ITS2F/ITS3R) según la metodología de Chen *et al.* (2010) en muestras aleatorias como un control endógeno de la PCR. En SSRs, se utilizó la metodología de 3 primers descrita por Blacket *et al.* (2012), previamente estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Las concentraciones de los reactivos fueron: 1X de Buffer (Invitrogen), 0.04 mg/ml de BSA, 0.32 mM de dNTPS (Invitrogen), 0.5 uM de primer reverse, 0.15 uM de primer forward, 0.5 uM del primer forward universal marcado con un fluoróforo y 1 U de Taq platinum. Según el loci (R01-R15), el MgCl₂ se agregó en una concentración distinta, en un rango de 1.6-2.5 mM. Por último, para R04 y R12 se usó 2 ul de ADN, y para los 13 restantes el volumen de ácido nucleico fue de 1 ul. Se usó un volumen final de 25 ul de mezcla de reacción para la amplificación. Por otra parte, el programa de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos. Luego 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, annealing durante 45 segundos según la temperatura de estandarización de cada primer y una extensión a 72°C por 45 segundos. La etapa final fue una extensión a 72°C durante 10 minutos. Las concentraciones del protocolo y la temperatura de annealing de cada primer se indican en la Tabla 2. Finalmente, los amplicones obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% p/p, en una fotografía tomada con el fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

2.5 Genotipado

Se enviaron tres series de placas MicroAmpTM Optical de Applied BiosystemsTM de los amplicones SSR a Macrogen Inc., Corea. El primer envío fue de las 68 muestras de Galápagos amplificadas con los primers R01, R02, R03 y R04. Debido a que los cuatro

loci tuvieron alelos monomórficos, para las amplificaciones de los 11 primers restantes (R05-R15). Se escogió 15 muestras representativas de Galápagos: 3 de Floreana (FLO001, FLO002 y FLO013), 4 de Isabela (ISA001, ISA005, ISA011 e ISA018), 4 de Santa Cruz (STX005, STX011, STX015 y STX021) y 4 de San Cristóbal (SCR001, SCR005, SCR024 y SCR029) (Anexo 1). Se escogió estas muestras porque comprenden un amplio rango geográfico. Finalmente, el tercer envío fue de 10 muestras del continente con las cuales se amplificó los 15 loci para comprobar si los primers también resultaban monomórficos en estas muestras.

Se usó 4 fluoróforos (6-FAM, VIC, NED y PET) para el genotipado de los microsatélites mediante una electroforesis capilar (Humanizing Genomics Macrogen, s.f.) utilizando un secuenciador Applied Biosystems ABI 3130xl. Los resultados de Macrogen, Inc. se analizaron con el software GeneMarker de SoftGenetics LLC. (2012). Con este programa se identificaron los alelos de cada locus en base a su tamaño y al patrón de fluorescencia de mayor intensidad en el electroferograma. Se tuvo como referencia el tamaño y el motivo de los loci reportado en la literatura (Tabla 1).

2.6 High-Resolution Melting (HRM)

En vista de que los 15 SSRs tuvieron alelos monomórficos en todos los individuos genotipados, se realizó la técnica High-Resolution Melting (HRM) para identificar si existen diferencias en la secuencia de los SSRs (Palais & Witter, 2009). Se usó este análisis porque Dossett, Bassil & Finn, (2012) reportaron alelos monomórficos en la especie *R. occidentalis* y detectaron diferencias en la secuencia con esta metodología.

Esta técnica consiste en añadir un paso de desnaturalización luego de la extensión final en el programa de termociclado de la PCR. Se usa un tinte intercalante (en este caso, SYBR Green) para visualizar curvas de fluorescencia generadas por diferentes

temperaturas de melting (T_m) de los amplicones, pues diferentes T_m podrían indicar diferencias en las secuencias. En este ensayo únicamente se utilizó el loci R08 pues fue uno de los que presentó mejores resultados en el estudio realizado por Dossett, Bassil & Finn, (2012). Con este loci se amplificó 20 reacciones (10 muestras representativas por duplicado): 5 de Galápagos (FLO013, ISA011, STX023, SCR024 y SCR029) y 5 de Ecuador continental (VCH001, MIN005, PUE002, INT002 y RIO002). Los datos se visualizaron en el programa en línea uAnalyze de la Universidad de UTAH y luego fueron procesados en Microsoft Excel, utilizando el método de normalización “línea base” (Palais & Witter, 2009). La muestra ISA011 y su duplicado, no presentaron un pico de temperatura de melting (T_m) por lo que fue descartada. El mismo problema ocurrió con los duplicados de las muestras FLO013, MIN005, INT002 y SCR024, descartando un total de 6 reacciones antes de la normalización de datos en Microsoft Excel. En consecuencia, se procesaron los datos de 14 reacciones. Luego de la normalización, se descartaron las muestras RIO002 y SCR029 ya que no hubo congruencia del pico T_m entre duplicados. Tampoco se tomó en cuenta el duplicado de la muestra STX023 por estar fuera del rango de fluorescencia y de temperatura. Por lo expuesto, de las 20 reacciones realizadas, se usaron los resultados de 7 muestras (FLO013, STX023, SCR024, MIN005, INT002, VCH001, PUE002) para graficar las curvas de fluorescencia.

3 RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de las muestras de *R. niveus*

La extracción y cuantificación de ADN genómico de las 68 muestras de mora de Galápagos y de las 10 muestras de Ecuador continental fue exitosa. El ADN extraído mostró una buena integridad en el gel de agarosa (Figura 1) al superar en tamaño al ladder Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA, utilizado como referencia. Se obtuvo una concentración promedio de ADN genómico de 33.69 ng/ul en las 78 muestras diluidas. La calidad de ADN obtenida de las relaciones de absorbancia fue en promedio 2.02 para la proporción A_{260}/A_{280} y 2.00 para la relación A_{260}/A_{230} .

3.2 Amplificación de primers SSR

Los 15 loci SSR amplificaron con las muestras colectadas en Galápagos y en el Ecuador continental. Únicamente los loci R07 y R10 presentaron bandas tenues (Figura 2). Además, la amplificación del control endógeno de la PCR (región ITS2) fue exitosa en 2 de las 3 muestras aleatorias escogidas. La amplificación fue limpia pues no se observaron bandas adicionales a la región de interés y no se contaminó el control negativo. Dicho resultado se muestra en el Anexo 4.

3.3 Análisis de electroferogramas

El tamaño de los alelos encontrados en general tuvo concordancia con el reportado en la literatura tanto para las muestras de Galápagos como para las de Ecuador continental (Tamaño reportado Tabla 1 y tamaño amplificado Tabla 4). Las 68 muestras de Galápagos que se amplificaron con los primers R01, R02, R03 y R04 mostraron alelos monomórficos. De igual manera, las 15 muestras representativas de Galápagos amplificadas con los primers restantes (R05-R15) y las 10 muestras del continente

amplificadas con todos los primers (R01-R15) mostraron alelos monomórficos. Un ejemplo de los electroferogramas de diferentes muestras insulares se indica en la Figura 3 y los electroferogramas de los alelos monomórficos de todos los loci se indican en la Figura 4. Estos resultados impidieron que se realizaran análisis estadísticos de diversidad.

3.4 High-Resolution Melting (HRM)

Las curvas de fluorescencia del HRM de las 7 muestras analizadas, tuvieron una distinta temperatura de melting (T_m), entre 76-78 °C. Las muestras se agruparon en 3 diferentes colores según su punto máximo de temperatura de melting (T_m). Grupo 1 (INT002, VCH001, PUE002, MIN005), grupo 2 (STX023 y SCR024) y grupo 3 (FLO013) (Figura 5).

4 DISCUSIÓN

4.1 Concentración, calidad del ADN y amplificación

El promedio de ADN con el que se trabajó (33.69 ng/ul) fue adecuado para la PCR, pues es una concentración cercana a 20 ng/ul, un valor de ADN genómico estándar en una reacción de PCR (Millipore, 2000) y con el que ya se ha amplificado ADN vegetal (Abdel-Latifl & Osman, 2017). Por otra parte, un pequeño porcentaje de muestras presentaron pellets con tonalidades amarillas y marrones translucidas, posiblemente porque los polifenoles característicos del tejido vegetal se unieron covalentemente al ADN extraído y lo oxidaron (Sahu, Thangaraj & Kathiresan, 2012). Pese a esto el ADN fue adecuado para los análisis realizados. La relación de absorbancia promedio A260/A280 y A260/A230 fue de 2.02 y 2, respectivamente. Esto indica una buena calidad del ADN, pues en la primera relación el valor es cercano a 1.8 y en la segunda está en un rango de 1.8-2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., 2009). Al ser mayores a 1.8 estas dos relaciones, se considera el ADN libre de impurezas absorbidas a 230 nm y 280 nm (fenoles, polisacáridos y proteínas) (Koetsier & Cantor, 2019). Adicionalmente, la amplificación de la región ITS2, con los primers universales ITS2F/ITS3R demostró que el ADN obtenido es apto para la PCR (Chen *et al.*, 2010).

En consecuencia, la amplificación de SSR heterólogos en *R. niveus*, en general fue exitosa al igual que en la tesis de Álvarez (2016). Únicamente los loci R07 y R10 presentaron bandas tenues. Se observan dímeros de primers en los gels de agarosa (Figura 2). Generalmente estos son un problema en la PCR, sin embargo, en este caso la eficiencia de la amplificación no se vio reducida. Posiblemente los dímeros se formaron por complementariedad de los primers en su extremo 3' y porque son comunes a partir de

los 30 ciclos de termociclado y en el presente protocolo se realizaron 35 ciclos (Brownie *et al.*, 1997).

4.2 Evaluación del monomorfismo de loci SSR en *R. niveus*.

El genotipado de los 15 SSR reveló un resultado interesante. Debido a que es una especie diploide (Meng & Finn, 2002; Thompson, 1995), se esperaba que al menos un porcentaje de la población analizada sea heterocigoto. No obstante, se observaron alelos monomórficos en cada uno de los 15 locus, tanto en la población de Galápagos (68) como en la de Ecuador Continental (10). Con estos resultados y tomando en cuenta que es el primer reporte de regiones microsátélites en esta especie, no se puede hablar de una baja o nula variabilidad genética. Cabe mencionar que en una investigación de filogenética molecular realizada por Quinton *et al.* (2011), se identificó que individuos de *R. niveus* de Galápagos y de diferentes partes del mundo, entre ellos, del Ecuador continental, son genéticamente cercanos entre sí. Por esto, sugieren que hay una falta de variabilidad en los individuos analizados. Específicamente, esto lo detectaron en la región ITS1-5.8S-ITS2 (ADN genómico) y en la región *trnL-trnF* del ADN del cloroplasto. Llegaron a esta conclusión al secuenciar, alinear y analizar los amplicones de dichas regiones. Sin embargo, las tres diferentes regiones de ADN analizadas (ITS1-5.8S-ITS2, cpADN y SSR en el presente estudio), no constituyen el genoma completo de la especie. Además, los 15 loci SSR analizados no son los únicos de *Rubus*. Éstos se distribuyen ampliamente en el genoma eucariota, tanto en regiones codificantes como no codificantes habiendo un gran número de este tipo de secuencias (Vieira *et al.*, 2016). Por lo expuesto, es importante hacer énfasis en el análisis de nuevos marcadores y, sobre todo, nuevas regiones de ADN que permitan llegar a una conclusión sobre la diversidad de la mora en Ecuador.

En los estudios de referencia de donde se tomaron los 15 loci SSR (Castillo *et al.* 2010; Graham *et al.* 2004; Marulanda *et al.*, 2012a, Marulanda *et al.* 2012b), se reportó un alto polimorfismo en diferentes especies del género *Rubus*. Sin embargo, López *et al.* (2019) indican que los microsatélites usados en el presente estudio pueden resultar en alelos monomórficos en algunas especies del género *Rubus*. Asimismo, Dossett, Bassil & Finn (2012) reportaron alelos monomórficos en *R. occidentalis*. Entre los loci que evaluaron están R04, R08 y R13 del presente estudio. Lo interesante de estos resultados es que *R. niveus* y *R. occidentalis* pertenecen al mismo subgénero que *R. idaeus* (*Idaeobatus*), la especie para la cual se diseñaron la mayoría de los primers (Foster *et al.* 2019). Esto sugiere que incluso en especies estrechamente relacionadas, una de ellas puede presentar alelos monomórficos en un determinado loci. Finalmente, Lee *et al.* (2015) analizaron 97 loci SSR en *Rubus* sp. y solo 29 fueron polimórficos, es decir, solo un 30%. En consecuencia, se sugiere que los microsatélites no son marcadores moleculares muy informativos en ciertas especies del género *Rubus*, por ejemplo, *R. niveus*.

4.3 Homoplasia molecular y High-Resolution Melting

Una de las razones del amplio uso de microsatélites en estudios moleculares, es porque se pueden identificar diferencias en el ADN en base al tamaño de los alelos, lo cual reduce recursos y costos (Mishra *et al.*, 2014). Sin embargo, tener un mismo tamaño no siempre significa que la secuencia de los alelos es la misma. El tamaño de los SSRs no siempre es resultado de la repetición perfecta de sus motivos. También existen SSRs compuestos (formados por más de un motivo) y otros con secuencias cortas intercaladas entre los motivos (Vieira *et al.*, 2016). Aranguren *et al.* (2005) indican que los SSRs tienen cierta cantidad de homoplasia molecular, es decir, que presentan alelos con un mismo tamaño, pero con secuencia distinta. En dicha revisión se plantea que la

homoplasia molecular es común en SSRs, sobre todo en compuestos, lo cual es congruente con los resultados obtenidos, porque 8 de los 15 microsatélites son compuestos (Tabla 1).

En este contexto, una alternativa económica y sencilla para el análisis de homoplasia molecular en SSRs es la metodología High-Resolution Melting. En la Figura 5 se observa que las curvas de fluorescencia forman 3 grupos según su pico de T_m y su tendencia. Las diferentes curvas sugieren que hay diferencias en las secuencias de las 7 muestras analizadas. Sin embargo, no es un resultado concluyente, porque se realizó solo una corrida preliminar en un solo loci (R08) y con un número limitado de muestras. Además, el método lineal usado para la normalización de datos es limitado. Palais & Witter (2009) lo utilizan, pero recomiendan normalizar los datos con un método exponencial para “eliminar la fluorescencia de fondo”. Finalmente, también es necesaria una secuenciación de los amplicones para confirmar las variaciones de nucleótidos (Dossett, Bassil & Finn, 2012), lo cual no se realizó en el presente proyecto.

4.4 Recomendaciones para futuras investigaciones

Hasta la presente fecha, el genotipo del género *Rubus* ha sido evaluado usando varios marcadores moleculares, tales como RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR e ITS (Foster *et al.*, 2019; Garrido *et al.*, 2020). No se identificó polimorfismos con algunos de los marcadores mencionados (Dossett, Bassil & Finn, 2012; Garrido *et al.*, 2020). Según Ryu *et al.* (2018) el nivel de variabilidad genética evidenciado en *Rubus* puede ser proporcional a los recursos moleculares limitados que se tiene para este género. Es por esto que se recomienda una secuenciación del genoma de *R. niveus*, porque no se tiene un amplio conocimiento de éste y porque ya se han secuenciado genomas de *Rubus* de importancia económica (Foster *et al.*, 2019). El secuenciamiento ha servido para diseñar

nuevos marcadores, como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que ya han presentado buenos resultados en la determinación de variabilidad (Ward *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2018; López *et al.*, 2019). La perspectiva futura en el género *Rubus* es desarrollar un chip SNP para genotipado de alto rendimiento (Foster *et al.*, 2019), lo cual sería muy útil para determinar la diversidad genética de *R. niveus* en Galápagos y así implementar un control biológico adecuado de esta especie.

5 CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos, la literatura revisada y porque actualmente hay un número limitado de SSR en *Rubus* (Foster *et al.*, 2019) se sugiere que para *R. niveus* los microsatélites no son adecuados para detectar diferencias genéticas según el tamaño de sus alelos. No se logró determinar el nivel de diversidad genética de las 68 muestras de *Rubus niveus*, de las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana. No fue posible calcular heterocigosidad, PIC, y cualquier otro índice de diversidad debido a los alelos monomórficos de los 15 loci SSR. En vista de que es el primer estudio de regiones microsatélites en esta especie, y la región analizada no constituye su genoma completo, no se puede hablar de una baja o nula variabilidad genética, pues sería caer en una generalización.

Por otra parte, los resultados del análisis High-Resolution Melting, sugieren que alelos con un mismo tamaño en pares de bases, podrían tener una secuencia distinta. Sin embargo, sugerir una diferencia en la secuencia de microsatélites tampoco permite determinar el nivel de variabilidad. En consecuencia, se recomienda usar otros marcadores moleculares y otras regiones de ADN, para estudiar la diversidad genética de *Rubus niveus*.

6 TABLAS

Tabla 1. Información general de los loci.

Loci	Especie	Referencia			
Rubus 116a	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012a	(CT)12(T)10	299	R01
Rg-A12-1	<i>R. glaucus</i>	Marulanda et al. 2012a	(GA)23	387-432	R02
RhM003	Rubus hybrid, Marion blackberry	Castillo et al. 2010; Marulanda et al. 2012b	(TG)10	173-264	R03
Rubus 16a	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012a;	(AT)8(GT)11	169	R04
Rubus 76b	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012b	(CT)5(CT)4	190-210	R05
RiM019	Rubus hybrid, Marion blackberry	Castillo et al. 2010; Marulanda et al. 2012b	(AG)12	146-196	R06
Rubleaf97	<i>R. idaeus</i>	Graham et al. 2004	(CTT)-(CCT)9	205	R07
RhM011	Rubus hybrid, Marion blackberry	Castillo et al. 2010; Marulanda et al. 2012b	(TC)18	252-346	R08
mRaCIRRIH3	<i>R. alceifolius</i>	Marulanda et al. 2012b	(GT)15(GA)17	160-226	R09
Rubus 126b	<i>R. idaeus</i>	Graham et al. 2004	(CT)31(CA)22	150-201	R10
Rubus 98d	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012a	(GAA)5(GA)10	198	R11
Rubus 259f	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012b	(CT)4(AG)8	265	R12
RhM021	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012a;	(TC)6	282	R13
Rubus 105b	<i>R. idaeus</i>	Marulanda et al. 2012b	(AG)8	165-173	R14
Rubus 275a	<i>R. idaeus</i>	Graham et al. 2004	(AG)27	114-145	R15

Se muestra los nombres de los loci encontrados en la literatura, la especie para la cual fueron diseñados, el estudio de referencia, el motivo del microsatélite, el tamaño reportado y el código alfanumérico otorgado a cada locus en el presente estudio.

Tabla 2. Condiciones de la estandarización con fluoróforo.

R01	61	0,4	0,04	1,6	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R02	53	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R03	51	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R04	57	0,4	0,04	2,5	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	40ng/µl
R05	51	0,4	0,04	1,6	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R06	58	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R07	53	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R08	56	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R09	53	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R10	53	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R11	51	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R12	59	0,4	0,04	2,5	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	40ng/µl
R13	55	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R14	58	0,4	0,04	1,6	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl
R15	55	0,4	0,04	2	0,32	0,8	0,5	0,15 µM	0,5 µM	20ng/µl

Los reactivos buffer, BSA, dNTPs, Taq platinum, y primers tienen la misma concentración para todos los loci. La temperatura de annealing, el magnesio y la concentración de ADN varía de acuerdo al locus.

Tabla 3. Tamaño amplificado de los SSR.

Código	Secuencia Primer (5' - 3')		
R01	F: CCAACCCAAAAACCTTCAAC R: GTTGTGGCATGGCCTTTTAT	Marulanda et al. 2012a	196
R02	F: TCATGTTTCATGTTTCGTGTG R: CTAACACGCGATAGAATAGG		179
R03	F: CCATCTCCAATTCAGTTCTTCC R: AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC	Castillo et al. 2010; Marulanda et al. 2012b	215
R04	F: TGTTGTACGTGTTGGGCTTT R: GGGTGTTCGCCAGTTTCAGT	Marulanda et al. 2012a;	148
R05	F: CTCACCCGAAATGTTCAACC R: GGCTAGGCCGAATGACTACA	Marulanda et al. 2012b	208
R06	F: ATTCAAGAGCTTAACTGTGGGC R: CAATATGCCATCCACAGAGAAA	Castillo et al. 2010; Marulanda et al. 2012b	210
R07	F: AACAAAGCTCCTCGACCAGA R: TCGAGATGGTCAGTCCAACA	Graham et al. 2004	229
R08	F: AAAGACAAGGCGTCCACAAC R: GGTTATGCTTTGATTAGGCTGG	Castillo et al. 2010; Marulanda et al. 2012b	295
R09	F: CTGGATGTGTGGGTGTGTATC R: CCTGGATATGTTTACCCTGACC	Marulanda et al. 2012b	163
R10	F: CCTGCATTTTTCTGTATTTGG R: TCAGTTTTCTTCCCACGGTTA	Graham et al. 2004	189
R11	F: GGCTTCTCAATTTGCTGTGTC R: TGATTTGAAATCGTGCGGTTA	Marulanda et al. 2012a	194
R12	F: TGGCACAAGAAGCCTGTAAC R: TCCCATATCCCTCAGCATTC	Marulanda et al. 2012b	259
R13	F: CAGTCCCTTATAGGATCCAACG R: GAACTCCACCATCTCCTCGTAG	Marulanda et al. 2012a;	302
R14	F: GAAAATGCAAGGCGAATTGT R: TCCATCACCAACACCACCTA	Marulanda et al. 2012b	165
R15	F: CACAACCAGTCCCAGAGAAAT R: CATTTCATCCAAATGCAACC	Graham et al. 2004	148

Se muestra el código de los loci, las secuencias de los primers forward y reverse, los estudios de referencia en donde reportaron estos loci y el tamaño amplificado que se visualizó en el gel de agarosa y se confirmó por el genotipado.

7 FIGURAS

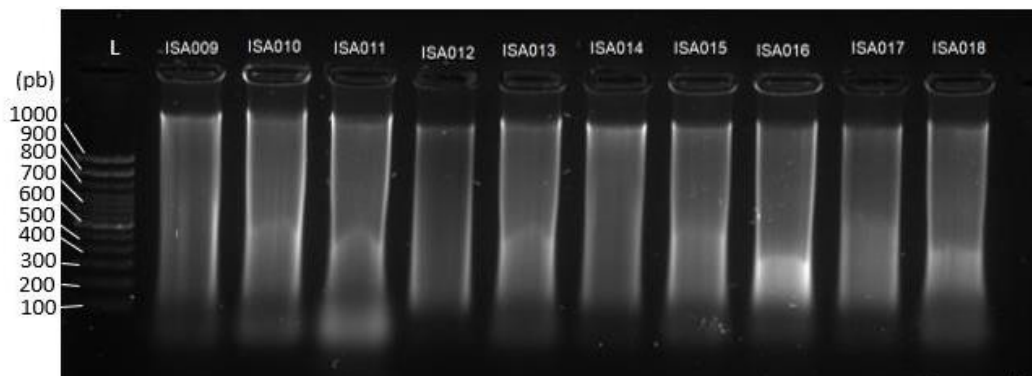


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

De izquierda a derecha. Pocillo 1: Ladder 1 Kb; pocillos 2-11: ADN genómico de muestras de la isla Isabela extraídas con el protocolo de CTAB.

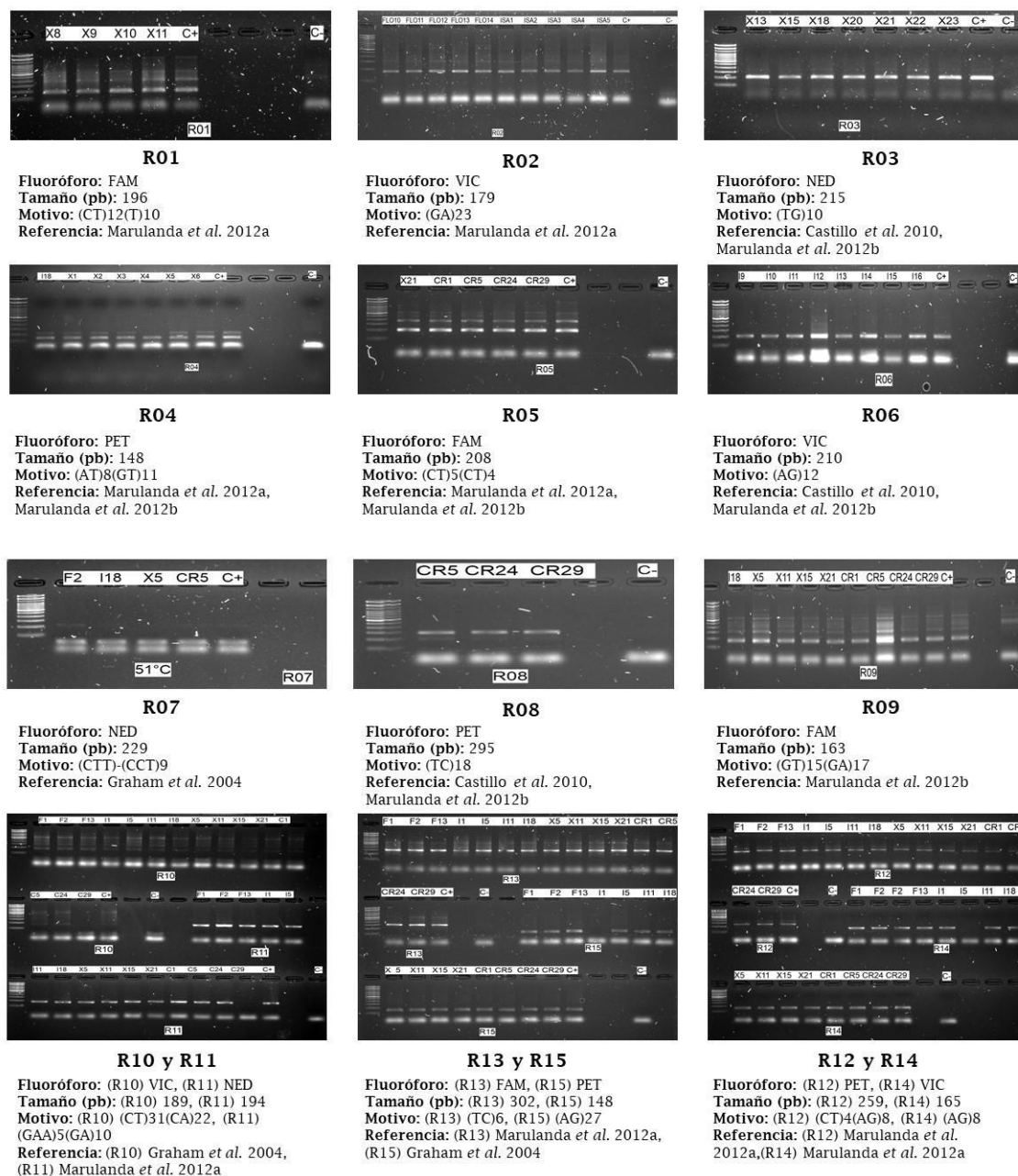


Figura 2. Amplificación de los 15 loci heterólogos en *R. niveus*.

Geles de electroforesis de los loci R01-R15. La descripción del fluoróforo, el tamaño aproximado, el motivo y la referencia de cada locus se encuentra bajo cada gel.

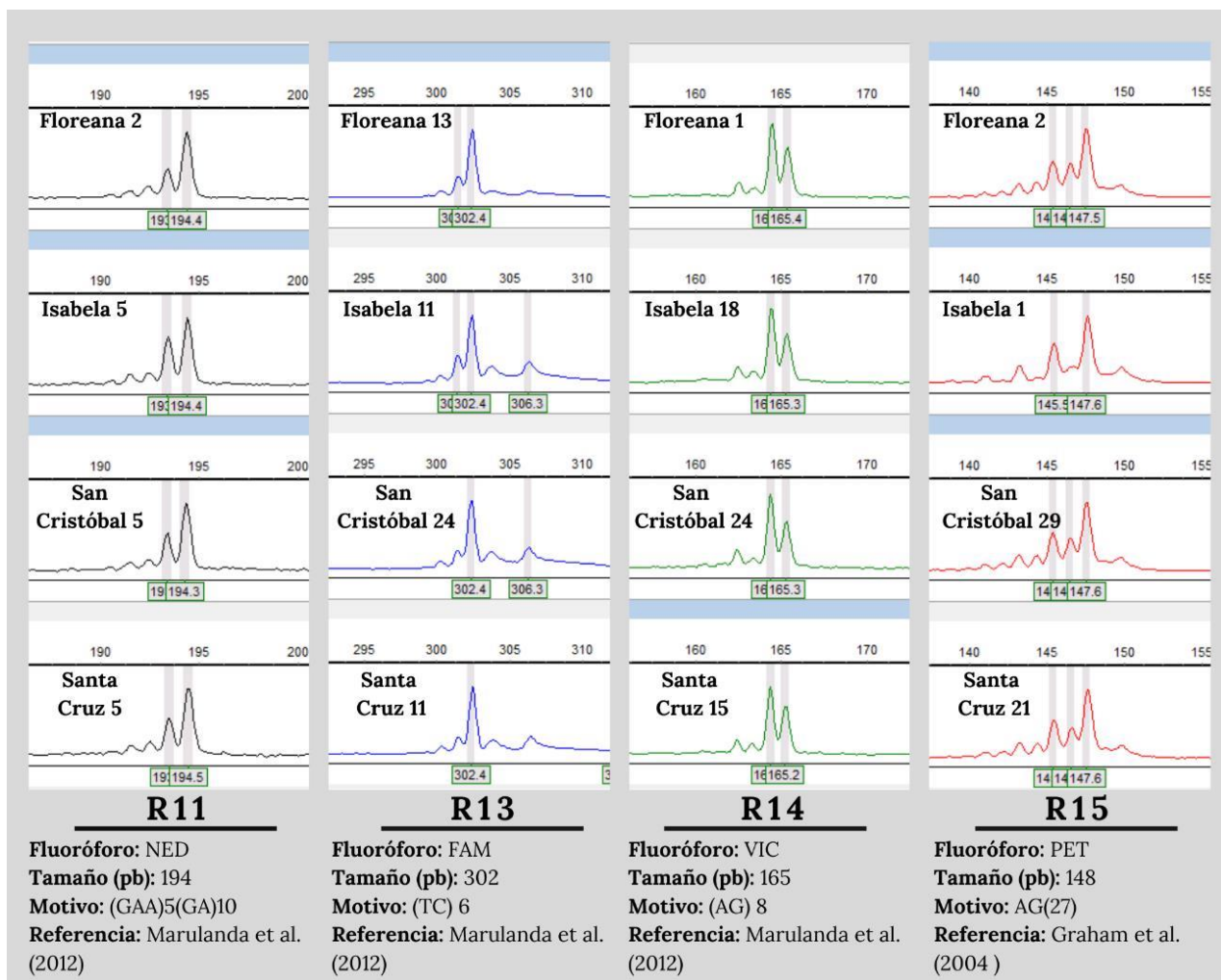


Figura 3. Electroferogramas de muestras aleatorias de Galápagos.

Los electroferogramas se obtuvieron en el programa GeneMarker SoftGenetics LLC.

(2012).

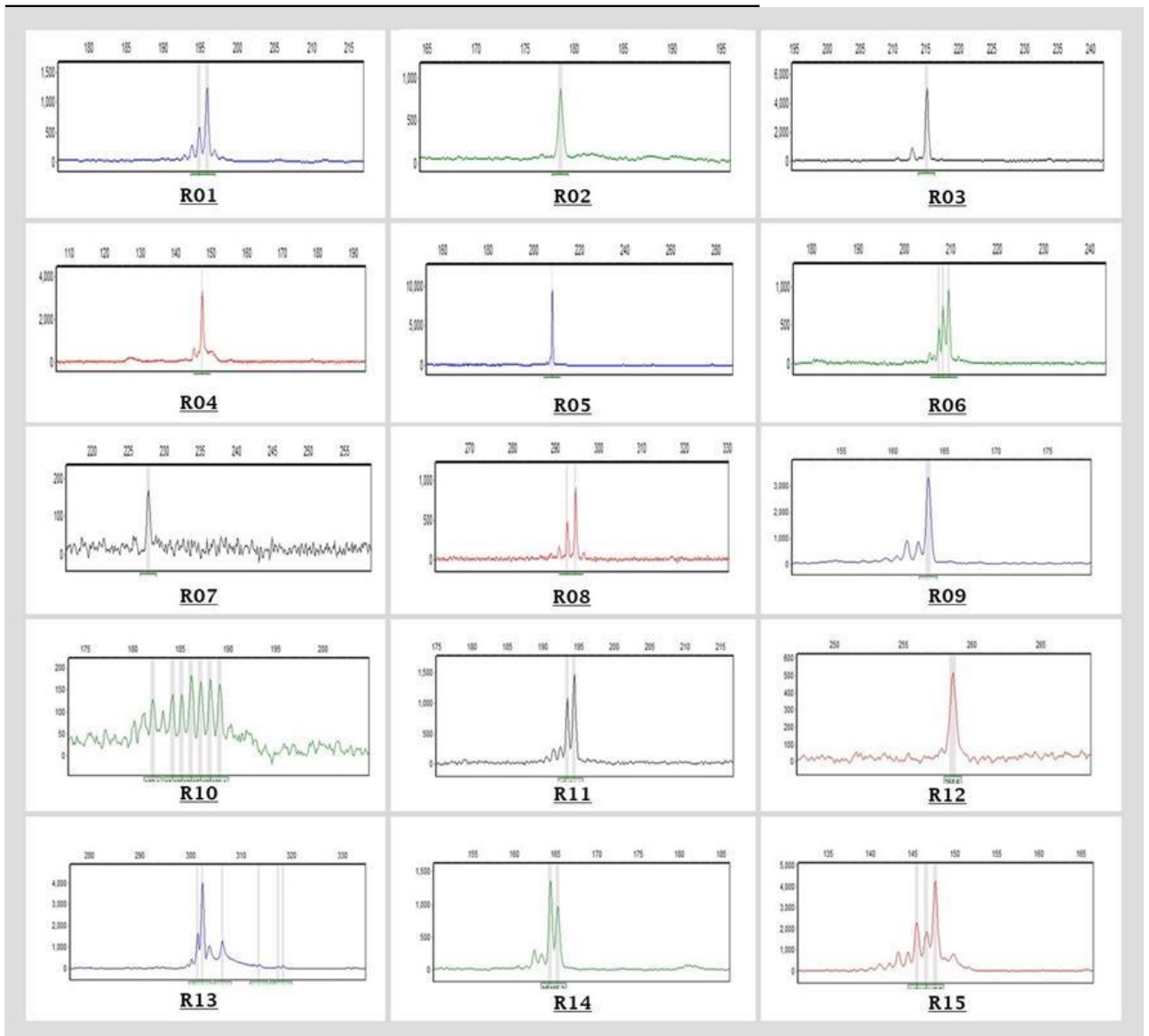


Figura 4. Electroferogramas de los 15 SSR.

Se observa los alelos monomórficos de cada uno de los 15 loci en *R. niveus*.

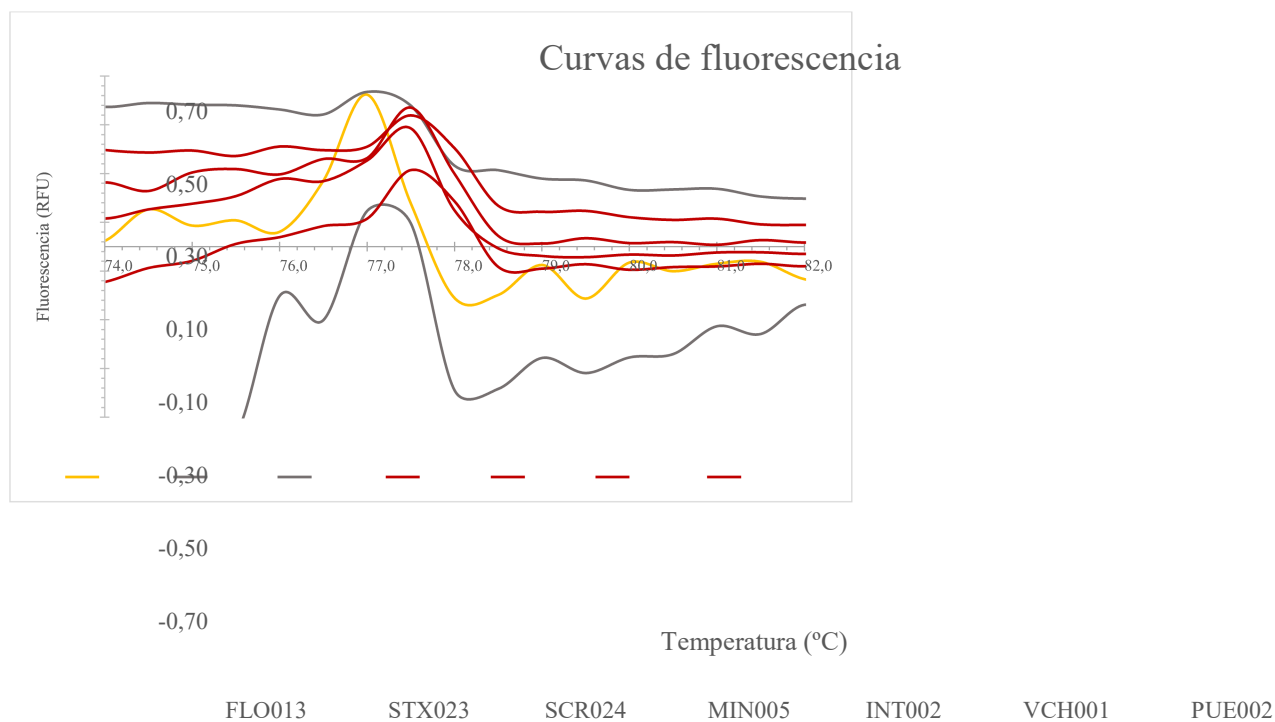


Figura 5. Curvas de fluorescencia del análisis High-Resolution Melting.

Se observa una muestra de Floreana (FLO013), una de Santa Cruz (STX023), una de San Cristóbal (SCR024) y 4 muestras del Ecuador continental (Mindo (MIN005), Intervalles (INT002), Valle de los Chillos (VCH001), Puenbo (PUE002)). El eje 'Y' corresponde a las Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) y el eje X a la temperatura (°C).

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1).
doi:10.1186/s13007-016-0152-4
- Ahmad, Mushtaq & Masood, Saima & Sultana, Shazia & Ben Hadda, Taibi & Bader, Ammar & Zafar, Muhammad. (2015). Antioxidant and nutraceutical value of wild medicinal Rubus berries. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 28.
- Álvarez, M. (2016). Evaluación de la variabilidad genética en cinco especies de mora (Rubus spp) mediante marcadores microsatélites SSR. Quito: Universidad San Francisco de Quito
- Amsellem, L., Dutech, C., & Billotte, N. (2001). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae), an invasive weed in La Reunion island. *Molecular Ecology Notes*, 1(1-2), 33–35.
doi:10.1046/j.1471-8278.2000.00013.x
- Aranguren Mendez, Jose Atilio & Román-Bravo, R. & Isea, W. & Villasmil, Yenen & Jordana, Jordi. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*. 13.
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., & Miller, A. D. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 456–463. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x

- Big Island Invasive Species Committee (BIISC). (2003). *Mysore Raspberry Rubus niveus*. Obtenido el 15 de julio de 2020 de http://www.hear.org/operationmiconia/BIISC_WEEDS_set.pdf
- Brownie, Jannine & Shawcross, Susan & Theaker, Jane & Whitcombe, D & Ferrie, R & Newton, C & Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic acids research*. 25. 3235-41. 10.1093/nar/25.16.3235.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W. E., Siemann, E., & Prati, D. (2005). Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, 144(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0070-z>
- Buddenhagen, C., & Jewell, K. J. (2006). Invasive plant seed viability after processing by some endemic galapagos birds. *Ornitologia Neotropical*, 17(1), 73-80.
Retrieved from www.scopus.com
- Caidan, R., Cairang, L., Liubin, & Yourui, S. (2013). Simultaneous Analysis of Fatty Acids in *Rubus niveus* Thunb. Fruits by HPLC-MS/MS. *Asian Journal of Chemistry*, 25(4), 1866–1870. doi:10.14233/ajchem.2013.13204
- Castillo, N.F., Reed, B. M., Graham, J., Fernández-Fernández, F., & Bassil, N. (2010). Microsatellite Markers for Raspberry and Blackberry, *Journal of the American Society for Horticultural Science J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 135(3), 271-278.
Retrieved from <https://journals.ashs.org/jashs/view/journals/jashs/135/3/article-p271.xml>

- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). (2019). *Rubus niveus* (Mysore raspberry). Retrieved from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107939#tosummaryOfInvasiveness>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*, 5(1), e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613
- Cimadom, A., Jäger, H., Schulze, C. H., Hood-Nowotny, R., Wappl, C., & Tebbich, S. (2019). Weed management increases the detrimental effect of an invasive parasite on arboreal darwin's finches. *Biological Conservation*, 233, 93-101. doi:10.1016/j.biocon.2019.02.025
- De la Torre, S. (2013). Research in Agricultural and Urban Areas in Galapagos: A Biological Perspective. En Walsh, S. J., & Mena, C. F. (Eds.), *Social and Ecological Interactions in the Galapagos Islands* (p. 185). Springer New York Heidelberg Dordrecht London. doi: 10.1007/978-1-4614-5794-7
- Dossett, M., Bassil, N. & Finn, C. (2012). High Resolution Melting Detects Sequence Polymorphism in *Rubus occidentalis* Monomorphic Microsatellite Markers. *Acta horticulturae*: 926(926):91-96
- Foster, T.M., Bassil, N.V., Dossett, M. et al. Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future. *Hortic Res* 6, 116 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0199-2>
- Fundación Charles Darwin. (s.f.). *Rubus niveus* Thunb. Obtenido el 07 de marzo de 2020 de <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=706>

- Garrido, P., Morillo, E., & Vásquez-Castillo, W. (2020). Genetic diversity of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) in Ecuador assessed by AFLP markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 1–8. doi:10.1017/s1479262120000283
- Global Invasive Species Database (GISD) (2020) *Species profile: Rubus niveus*. Obtenido el 15 de julio de 2020 de <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=1232>.
- Graham, J., Smith, K., MacKenzie, K., Jorgenson, L., Hackett, C., & Powell, W. (2004). The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(4), 740–749. doi:10.1007/s00122-004-1687-8
- Guerrero, A. M., & Tye, A. (2011). Native and introduced birds of galapagos as dispersers of native and introduced plants. *Ornitologia Neotropical*, 22(2), 207-217. Retrieved from www.scopus.com
- Heinke Jäger "Biology and Impacts of Pacific Island Invasive Species. 11. *Cinchona pubescens* (Red Quinine Tree) (Rubiaceae)," *Pacific Science* 69(2), 133-153, (1 April 2015). <https://doi.org.ezbiblio.usfq.edu.ec/10.2984/69.2.1>
- Humanizing Genomics MacroGen. (s.f.). Fragment Analysis Service. Obtenido el 22 de mayo de 2020 de https://www.macrogen.com/en/business/ces_service3.php
- Iwasa, J. & Marshall, W. (2018). Secuencias de DNA altamente repetidas. *Karp Biología celular y molecular*. pp. 384-385. México: Mc-GRAW HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Jäger, H. (2018). "Mora". Fundación Charles Darwin (FCD) y WWF-Ecuador. (2018). *cab* Quito, FCD y WWFEcuador: 163

- J.M. St. Quinton , M.F. Fay , M. Ingrouille & J. Faull (2011): Characterisation of *Rubus niveus*: a prerequisite to its biological control in oceanic islands, *Biocontrol Science and Technology*, 21:6, 733-752
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. Technical Note. New England Biolabs
- Kumar et al. (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology, *Plant Omics Journal*, 2(4):141-162
- Laso, F. J., Benítez, F. L., Rivas-Torres, G., Sampedro, C., & Arce-Nazario, J. (2020). Land cover classification of complex agroecosystems in the non-protected highlands of the galapagos islands. *Remote Sensing*, 12(1) doi:10.3390/RS12010065
- Laweson, J. & Ortiz, L. (1994). Plantas introducidas en las Islas Galápagos. *Investigación Botánica y Manejo en Galápagos*. (224-235). Quito: USAID
- Lee, G. A., Song, J. Y., Choi, H. R., Chung, J. W., Jeon, Y. A., Lee, J. R., Ma, K. H., & Lee, M. C. (2015). Novel microsatellite markers acquired from *Rubus coreanus* miq. and cross-amplification in other *Rubus* species. *Molecules*, 20(4), 6432–6442. <https://doi.org/10.3390/molecules20046432>
- Lemos, S. C. M., Lia Rejane Silveira, R., Karol Buuron, S., Silvia Machado dos Santos, R., & Charlene Moro, S. (2019). Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. *Gene*, 144175. doi:10.1016/j.gene.2019.144175

- López, A. M., Barrera, C. F., & Marulanda, M. L. (2019). Evaluation of SSR and SNP markers in *Rubus glaucus* benth progenitors selection. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(1), 1–14. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019081>
- Lörz, H., & Wenzel, G. (Eds.). (2005). *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. doi:10.1007/b137756
- Kundan, Mishra K., Fougat, Ballani, Vinita, T., Yachana, J., & Madhumati, B. (2014). Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Int. J. Pure App. Biosci*, 2(1), 169-188.
- Malanson, G., & Walsh, S. (2013). A Geographical Approach to Optimization of Response to Invasive Species. En Walsh, S. J., & Mena, C. F. (Eds.), *Social and Ecological Interactions in the Galapagos Islands* (p. 206). Springer New York Heidelberg Dordrecht London. doi: 10.1007/978-1-4614-5794-7
- Marulanda, M., López, A., & Uribe, M. (2012a). Genetic Diversity and Transferability of *Rubus* Microsatellite Markers to South American *Rubus* Species. 10.5772/32838.
- Marulanda, M., López, A. M., & Uribe, M. (2012b). Molecular characterization of the Andean blackberry, *Rubus glaucus*, using SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 322–331. doi:10.4238/2012.february.10.3
- Meng, R., & Finn, C. (2002). Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(5), 767–775. <https://doi.org/10.21273/jashs.127.5.767>
- Millipore, M. (2000). PCR Protocols and Guides gene discovery PCR Protocols and Guides. 50. www.merck4chemicals.com.

- Moity, N., & Rivas, G. (2018). "Ecosistemas". Fundación Charles Darwin (FCD) y WWF-Ecuador. (2018). cab Quito, FCD y WWFEcuador: 36
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4326. doi:10.1093/nar/8.19.4321
- NCBI. (s.f.). Sequence-Tagged Sites (STS). Obtenido el 16 de junio de 2020 de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techsts/#:~:text=Sequence%2DTagged%20Site%20\(STS\),in%20the%20genome%20is%20mapped](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techsts/#:~:text=Sequence%2DTagged%20Site%20(STS),in%20the%20genome%20is%20mapped).
- Palais, R., & Wittwer, C. T. (2009). Chapter 13 Mathematical Algorithms for High-Resolution DNA Melting Analysis. *Computer Methods, Part A*, 323–343. doi:10.1016/s0076-6879(08)03813-5
- Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER). (2012). *Rubus niveus*. Obtenido el 15 de julio de 2020 de http://www.hear.org/pier/species/rubus_niveus.htm
- Parque Nacional Galápagos (PNG) (s.f.). Términos de referencia para la prestación de servicios para realizar monitoreo, delimitación y control de mora (*Rubus niveus*) en la isla Santiago y la Isla Floreana [pdf] Ministerio del Ambiente
- Prentis, P. J., Sigg, D. P., Raghu, S., Dhileepan, K., Pavasovic, A., & Lowe, A. J. (2009). Understanding invasion history: genetic structure and diversity of two globally invasive plants and implications for their management. *Diversity and Distributions*, 15(5), 822–830. doi:10.1111/j.1472-4642.2009.00592.x
- Rentería, J. L., Gardener, M. R., Panetta, F. D., Atkinson, R., & Crawley, M. J. (2012a). *Possible Impacts of the Invasive Plant Rubus niveus on the Native*

Vegetation of the Scalesia Forest in the Galapagos Islands. PLoS ONE, 7(10), e48106. doi:10.1371/journal.pone.0048106

Rentería, J. L., Gardener, M. R., Panetta, F. D., & Crawley, M. J. (2012b). *Management of the Invasive Hill Raspberry (Rubus niveus) on Santiago Island, Galapagos: Eradication or Indefinite Control? Invasive Plant Science and Management, 5(01), 37–46. doi:10.1614/ipsm-d-11-00043.1*

Richardson, D. M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D., & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity Distributions, 6(2), 93–107. doi:10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x*

Ruben H. Heleno, Jens M. Olesen, Manuel Nogales, Pablo Vargas and Anna Traveset
2013Seed dispersal networks in the Galápagos and the consequences of alien plant
invasionsProc. R. Soc. B.28020122112 <http://doi.org/10.1098/rspb.2012.2112>

Ryu J, Kim WJ, Im J, et al. Genotyping-by-sequencing based single nucleotide polymorphisms enabled kompetitive allele specific PCR marker development in mutant Rubus genotypes. *Electron J Biotechnol* 2018;35. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.08.001>.

Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology, 2012, 1–6. doi:10.5402/2012/205049*

Starr, F., Starr, K., & Loope, L. (2003). *Rubus niveus f. a*. Obtenido el 15 de julio de 2020 de http://www.hear.org/Pier/pdf/pohreports/rubus_niveus_f_a.pdf

- Thompson, M. M. (1995). Chromosome numbers of *Rubus* species at the national clonal germplasm repository. *HortScience*, 30(7), 1447–1452. <https://doi.org/10.21273/hortsci.30.7.1447>
- Tsutsui, N. D., Suarez, A. V., Holway, D. A., & Case, T. J. (2000). *Reduced genetic variation and the success of an invasive species. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5948–5953. doi:10.1073/pnas.100110397
- Valle, C. (2013). Science and Conservation in the Galapagos Islands. En Walsh, S. J., & Mena, C. F. (Eds.), *Social and Ecological Interactions* (pp.7-11). Springer New York Heidelberg Dordrecht London. doi: 10.1007/978-1-4614-5794-7
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312–328. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2016-0027
- Ward, J.A., Bhangoo, J., Fernández-Fernández, F. et al. Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC Genomics* 14, 2 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-2>
- Zhang, Z., Xie, W., Zhao, Y. et al. EST-SSR marker development based on RNA-sequencing of *E. sibiricus* and its application for phylogenetic relationships analysis of seventeen *Elymus* species. *BMC Plant Biol* 19, 235 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1825-8>

9 ANEXOS

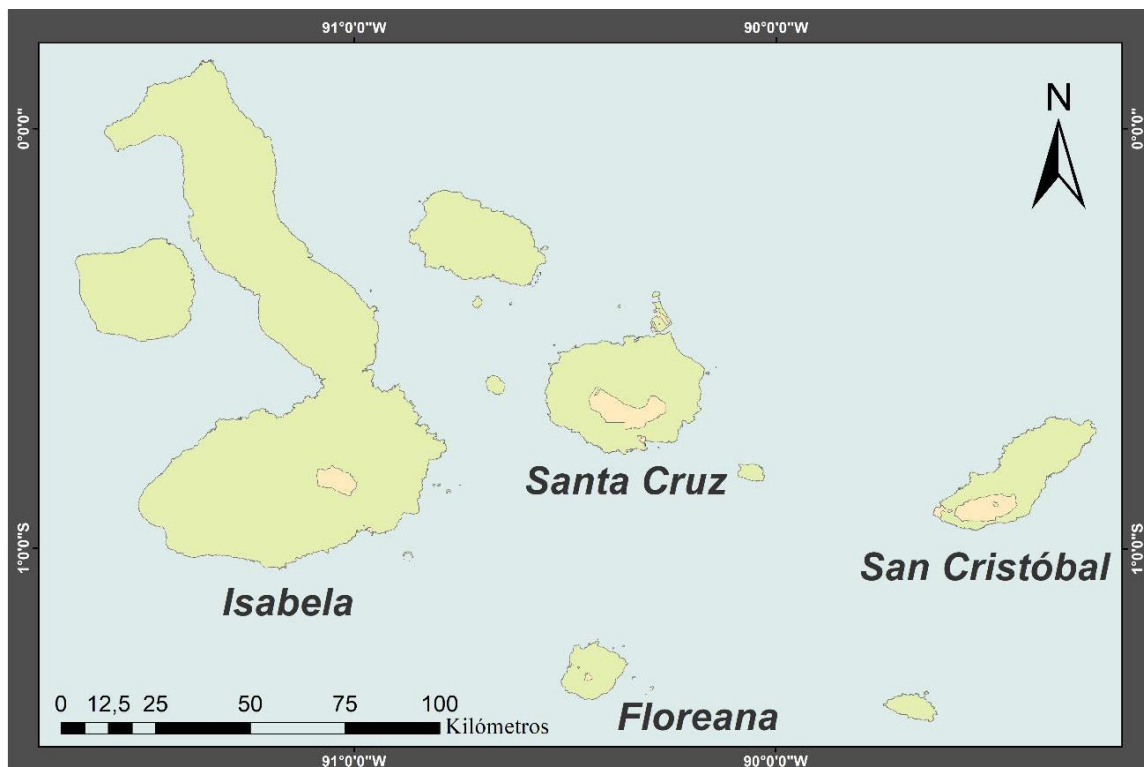
ANEXO 1: Muestras de *R. niveus* y sus sitios de recolección en Galápagos.

Isla	No. (Foto)	No. (Foto)	Código	Longitud (Sur)	Longitud (Oeste)	Alt.	
	1	1	SCR001	-0,91069	-89,57011	247	8 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	2	2	SCR005	-0,89675	-89,48038	668	San Cristobal Biological Reserve
	3	3	SCR007	-0,89330	-89,48288	626	San Cristobal Biological Reserve
	4	4	SCR008	-0,89350	-89,48605	589	San Cristobal Biological Reserve
	5	5	SCR009	-0,89427	-89,48822	573	San Cristobal Biological Reserve
	6	6	SCR010	-0,89752	-89,50238	607	14 km al este de Puerto Baquerizo Moreno
	7	7	SCR013	-0,90647	-89,51438	544	13 km al este de Puerto Baquerizo Moreno
	8	8	SCR014	-0,90000	-89,52466	546	11 km al este de Puerto Baquerizo Moreno
San	9	9	SCR017	-0,90675	-89,53425	458	10 km al este de Puerto Baquerizo Moreno
Cristóbal	10	10	SCR019	-0,91058	-89,53569	422	9 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	11	11	SCR021	-0,91405	-89,52919	393	10 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	12	12	SCR022	-0,91911	-89,52402	367	11 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	13	13	SCR024	-0,92924	-89,50150	175	15 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	14	14	SCR025	-0,92944	-89,50866	200	14 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	15	15	SCR026	-0,91880	-89,55477	234	8 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	16	16	SCR027	-0,91794	-89,55369	245	8 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	17	17	SCR029	-0,93102	-89,54691	147	9 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	18	18	SCR030	-0,92947	-89,54611	178	9 km al sureste de Puerto Baquerizo Moreno
	19	1	STX001	-0,70197	-90,32694	167	Bellavista
	20	2	STX002	-0,68566	-90,30208	230	Vía playa el Garrapatero
	21	3	STX003	-0,68261	-90,29650	244	Vía playa el Garrapatero
	22	4	STX004	-0,67811	-90,28780	247	Vía playa el Garrapatero
	23	5	STX005	-0,67000	-90,27408	271	El cascajo
	24	6	STX006	-0,68461	-90,32358	257	Vía al Camote
	25	7	STX008	-0,67955	-90,32200	314	Vía al Camote
	26	8	STX009	-0,67558	-90,32144	359	Vía al Camote
Santa Cruz	27	9	STX010	-0,67383	-90,32158	377	Vía al Camote
	28	10	STX011	-0,66919	-90,32388	448	Vía al Camote
	29	11	STX012	-0,69438	-90,33227	197	Santa Cruz Hwy
	30	12	STX013	-0,68786	-90,34800	249	Santa Cruz Hwy
	31	13	STX015	-0,67747	-90,37738	320	Santa Cruz Hwy
	32	14	STX018	-0,65861	-90,39994	427	Santa Cruz Hwy
	33	15	STX020	-0,63497	-90,39541	554	Santa Cruz Hwy
	34	16	STX021	-0,62497	-90,38450	605	Los Gemelos
	35	17	STX022	-0,62563	-90,38544	612	Los Gemelos
	36	18	STX023	-0,62488	-90,38544	609	Los Gemelos
	37	1	ISA001	-0,84908	-91,04127	410	Santo Tomás, a 17 km al oeste de Puerto Villamil
	38	2	ISA002	-0,84725	-91,04783	452	Santo Tomás, a 18 km al oeste de Puerto Villamil
	39	3	ISA003	-0,84183	-91,04913	487	Santo Tomás, a 18 km al oeste de Puerto Villamil
	40	4	ISA004	-0,84402	-91,05247	498	Santo Tomás, a 18 km al oeste de Puerto Villamil
	41	5	ISA005	-0,84391	-91,06288	553	Santo Tomás, a 19 km al oeste de Puerto Villamil
	42	6	ISA006	-0,84305	-91,07013	606	Santo Tomás, a 20 km al oeste de Puerto Villamil
	43	7	ISA007	-0,84125	-91,07697	673	Santo Tomás, a 21 km al oeste de Puerto Villamil
	44	8	ISA008	-0,83858	-91,07836	715	Santo Tomás, a 22 km al oeste de Puerto Villamil
Isabela	45	9	ISA009	-0,83769	-91,08255	765	Santo Tomás, a 22 km al oeste de Puerto Villamil
	46	10	ISA010	-0,83752	-91,08494	803	Santo Tomás, a 22 km al oeste de Puerto Villamil
	47	11	ISA011	-0,83730	-91,08927	862	Santo Tomás, a 23 km al oeste de Puerto Villamil
	48	12	ISA012	-0,83738	-91,08702	835	Santo Tomás, a 23 km al oeste de Puerto Villamil
	49	13	ISA013	-0,83805	-91,08027	752	Santo Tomás, a 22 km al oeste de Puerto Villamil
	50	14	ISA014	-0,84233	-91,07366	657	Santo Tomás, a 21 km al oeste de Puerto Villamil
	51	15	ISA015	-0,84338	-91,05344	524	Santo Tomás, a 18 km al oeste de Puerto Villamil
	52	16	ISA016	-0,83950	-91,05394	534	Santo Tomás, a 18 km al oeste de Puerto Villamil
	53	17	ISA017	-0,83591	-91,05794	556	Santo Tomás, no hay referencia en km
	54	18	ISA018	-0,83213	-91,05002	508	Santo Tomás, no hay referencia en km
	55	1	FLO001	-1,31208	-90,44913	340	675 m al este del Criadero de Tortugas
	56	2	FLO002	-1,31519	-90,45086	418	597 m al este del Criadero de Tortugas
	57	3	FLO003	-1,31508	-90,45077	410	602 m al este del Criadero de Tortugas
	58	4	FLO004	-1,31508	-90,45077	402	602 m al este del Criadero de Tortugas
	59	5	FLO005	-1,31483	-90,45058	393	615 m al este del Criadero de Tortugas
	60	6	FLO006	-1,31427	-90,44997	380	655 m al este del Criadero de Tortugas
Floreana	61	7	FLO007	-1,31933	-90,44466	308	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	62	8	FLO008	-1,31972	-90,44488	312	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	63	9	FLO009	-1,32027	-90,44500	312	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	64	10	FLO010	-1,32041	-90,44436	310	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	65	11	FLO011	-1,32083	-90,44400	310	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	66	12	FLO012	-1,32100	-90,44319	305	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	67	13	FLO013	-1,32108	-90,44266	299	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas
	68	14	FLO014	-1,31963	-90,44388	306	1 km al nordeste del Criadero de Tortugas

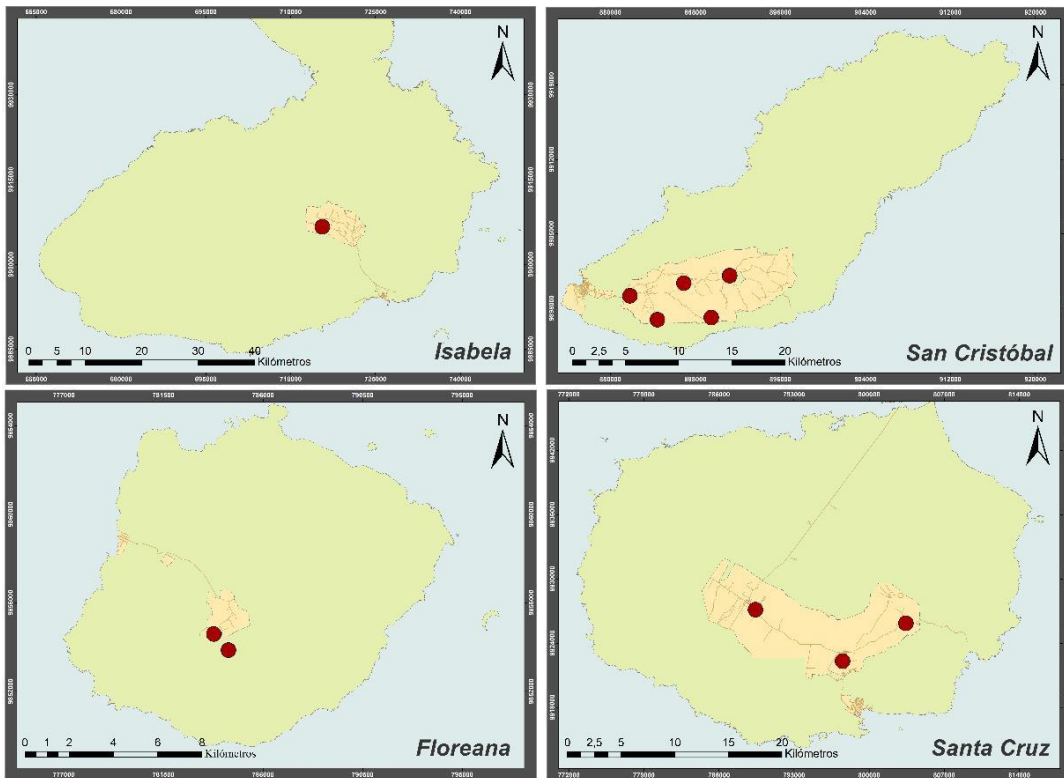
De izquierda a derecha. Columna 1: conteo total de muestras, columna 2: Conteo de muestras por isla, columna 3: código de 3 caracteres de cada muestra, columna 4: coordenadas latitud (Sur), columna 5: coordenadas longitud (Oeste), columna 6: altura del sitio muestreado, columna 7: localidad del sitio muestreado. Las celdas en amarillo son las 15 muestras representativas amplificadas y genotipadas con los loci R05-R15.

ANEXO 2: Mapa de los sitios de muestreo en las islas Galápagos realizado en ArcMap 10.5.

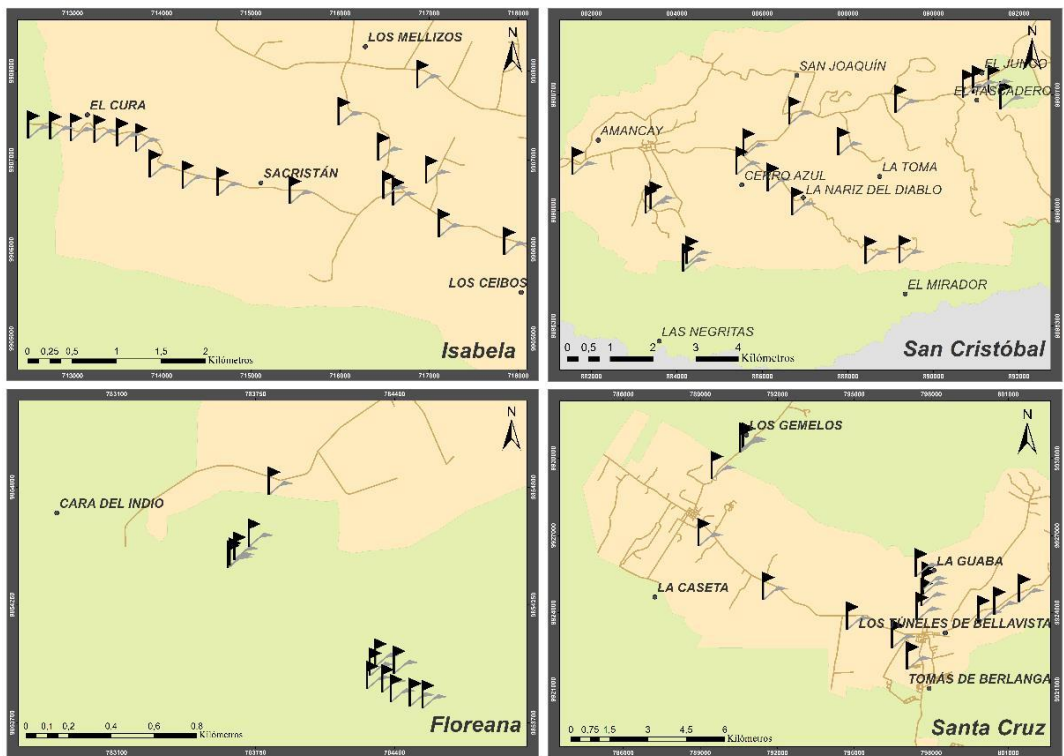
(a)



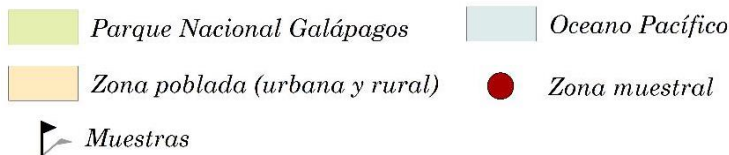
(b)



(c)



Leyenda



Simbología

- Localidad
- Carretera

Sistema de Coordenadas: WGS 84 Zona 15 Sur (Isabela, Floreana, Santa Cruz), 16 Sur (San Cristóbal)

Proyección: UTM

Datum: WGS 84

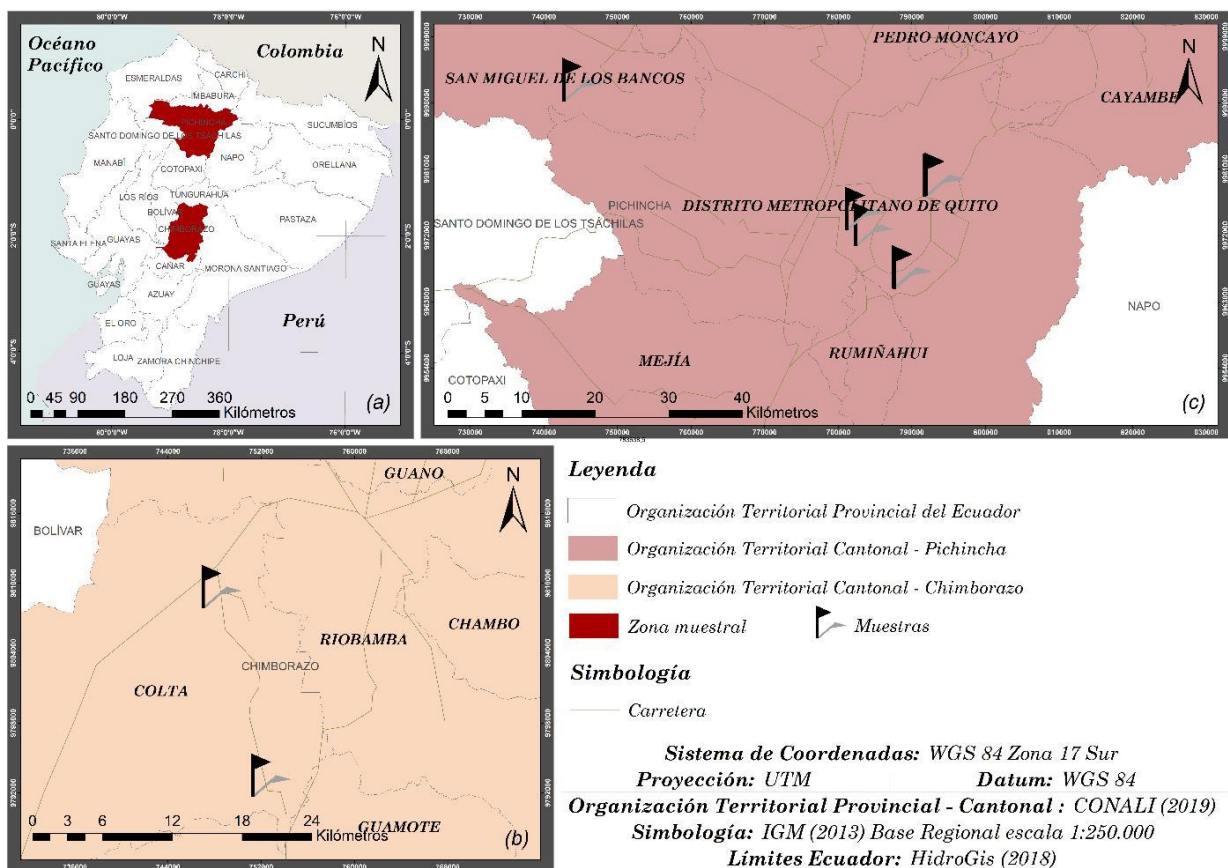
Carta Topográfica Galápagos: IGM (2019) Escala 1:50000

Parque Nacional Galápagos (SNAP): Guía interactiva MAE (s.f.)

(a) Islas Galápagos (b) Islas en donde se realizó la recolección (c) Ubicación de las muestras en cada isla.

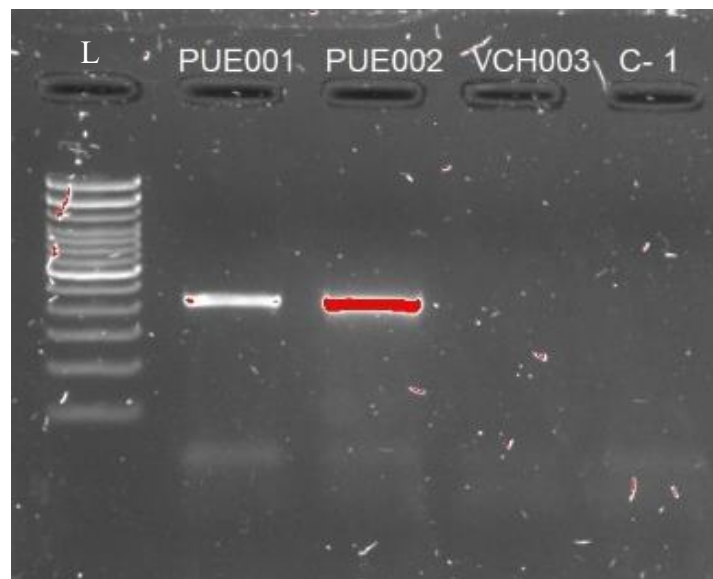
ANEXO 3: Mapa de los sitios de muestreo en Ecuador continental realizado en

ArcMap 10.5.



(a) Provincias en las que se realizó la recolección de muestras (b) Ubicación de las muestras en Chimborazo (c) Ubicación de las muestras en Pichincha. Las muestras con coordenadas geográficas cercanas se agrupan en un mismo banderín en el mapa, por esto, se muestran 7 banderines correspondientes a las 10 muestras del continente.

ANEXO 4: Amplificación de regiones ITS en *R. niveus*



De izquierda a derecha: pocillo 1: Ladder 1Kb; pocillo 2: muestra PUE001; pocillo 3: muestra PUE002; pocillo 4: VCH003; pocillo 5: control negativo. Los resultados de la PCR muestran que la región ITS2 de las muestras aleatorias, se amplificó con éxito mediante los primers universales ITS2F / ITS3R.