

## Diversidad genética de especies de *Rubus* determinada mediante RAPD

### Genetic diversity of *Rubus* species determined by RAPD

Sara Roa<sup>1\*</sup>, Hilda Fernández<sup>2</sup>, Luís Castro<sup>2</sup> y Nora Useche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Táchira). <sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). \*Correos electrónicos: sroa@inia.gov.ve; sararoadelgado@gmail.com

#### RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia de las Rosáceas y comprende numerosas especies cultivadas y silvestres. En Venezuela se cultiva la especie *R. glaucus* en los estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara y Aragua. Algunas especies silvestres promisorias crecen cercanas a *R. glaucus*, entre ellas *R. idaeus* conocida como frambuesa. La falta de variedades comerciales de mora, así como la preservación de especies silvestres, plantea la necesidad de realizar mejoramiento genético. El objetivo de este trabajo fue la amplificación del ADN mediante marcadores RAPD en especies del género *Rubus* de los estados Táchira y Aragua, para determinar la diversidad genética. El ADN se extrajo de hojas frescas de *R. glaucus*, *R. idaeus* y *Rubus* spp. Se utilizaron 23 iniciadores RAPD y se seleccionaron OPA10, OPA18, OPW06, OPB09, OPM10, OPK20, que produjeron 44 bandas de las cuales 38 fueron polimórficas. El iniciador OPW06 resultó el más informativo con un PIC de 0,38. Los análisis de agrupamiento y coordenadas principales coincidieron, discriminando la especie *R. idaeus* del resto de las especies, como también separaron los genotipos del estado Aragua de los del estado Táchira. La similitud entre genotipos en un mismo estado, sugiere la probable influencia del cruce de polen entre especies silvestres y cultivadas, así como el intercambio de material de propagación clonal utilizado por los productores. Estos resultados podrán ser utilizados en programas de conservación de especies y mejoramiento genético que incluyan cruzamientos interespecíficos.

**Palabras clave:** *Rubus glaucus* Benth, *Rubus idaeus* L., mora, especies silvestres, ADN, marcadores moleculares.

#### ABSTRACT

The andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) belongs to the family *Rosaceae*, which includes many cultivated and wild species. In Venezuela *R. glaucus*, is cultivated in Táchira, Mérida, Trujillo, Lara and Aragua states. Promising wild species grow close to *R. glaucus*, including *R. idaeus* known as raspberry. Lack of commercial varieties of blackberry, as well as for the preservation of wild species, raises the need for genetic improvement. The objective of this work was the amplification of DNA by RAPD markers in species of the genus *Rubus* of Táchira and Aragua states, to determine the genetic diversity. DNA was extracted from fresh leaves of *R. glaucus*, *R. idaeus* and *Rubus* spp. 23 RAPD primers were used, and OPA10, OPA18, OPW06, OPB09, OPM10, OPK20 were selected, which produced 44 bands of which 38 were polymorphic. OPW06 was the most informative initiator with a PIC of 0.38. The cluster analysis and principal coordinates separated the species *R. idaeus*, other species and also discriminated species from Táchira state with regard to Aragua state. The similarity between genotypes in the same state indicates a probable influence of pollen exchange between wild and cultivated species, as well as the exchange of clonal propagated materials used by the producers. These results may be used in conservation of species and genetic improvement that includes interspecific crosses.

**Key words:** *Rubus glaucus* Benth, *Rubus idaeus* L., blackberry, wild species, ADN, molecular markers.

## INTRODUCCIÓN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) pertenece a la familia *Rosaceae*, del género *Rubus*, cuyas numerosas especies se consiguen en altitudes que comprenden desde el nivel del mar hasta los 4500 m.s.n.m. (Marulanda *et al.*, 2007). El género *Rubus* posee un importante número de especies en el reino vegetal, con aproximadamente 700 a nivel mundial, entre ellas se encuentra *R. glaucus*, llamada mora de castilla, con frutos denominados comúnmente como moras.

Entre las especies más destacadas de este género se encuentran *Rubus idaeus* L. cuyo fruto se conoce como frambuesa o “raspberry”, así como diferentes *Rubus* cultivadas o “zarzas” que producen frutos denominados “blackberrys” o “zarzamoras”.

La mora de castilla (*R. glaucus*) cultivada en Venezuela, es considerada un híbrido, pues combina características de los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus*, además de ser un anfidiplóide fértil (Jennings, 1998; citado por Marulanda *et al.*, 2007).

El cultivo de la mora de castilla es importante, tanto desde el punto de vista nutricional, por sus propiedades antioxidantes, como en lo que al aspecto económico se refiere.

Para los productores de la región andina este cultivo, representa su principal fuente de ingresos, algunas veces su base de subsistencia, por ser una fuente de empleo que incluye la mano de obra familiar, aunado a los ingresos que genera en forma continua a través de la comercialización semanal de la fruta fresca o procesada, artesanal o industrial.

Las plantaciones comerciales de mora de castilla en el país están localizadas en los estados Aragua, Barinas, Mérida, Táchira y Trujillo.

En Venezuela, la falta de variedades comerciales de mora y otras especies de *Rubus* a los fines de satisfacer las necesidades de productores y consumidores, así como la preservación de especies silvestres, ha motivado el interés de mejorarla genéticamente, por lo que se requiere conocer la diversidad genética de la especie.

La diversidad genética dentro de una especie o entre especies puede medirse de diferentes formas, la más común es mediante descriptores morfológicos. Sin embargo, los resultados pueden ser influenciados por el medio ambiente. Otras formas más eficientes y certeras para medir la diversidad genética son los marcadores moleculares. Las aplicaciones de los marcadores moleculares como los RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) utilizados en este trabajo, han sido documentadas en especies frutales (Azofeifa, 2006).

Con relación al uso de los RAPD en *Rubus*, Graham y McNicol (1995), midieron la habilidad de estos marcadores para determinar las relaciones genéticas entre genotipos emparentados y no emparentados de *Rubus* spp., concluyeron que todos los marcadores resultaron idóneos, ya que fueron polimórficos y detectaron las diferencias entre los materiales estudiados.

Patamsytë *et al.* (2005 y 2008) estudiaron la diversidad genética de una colección de 49 accesiones de *Rubus idaeus* usando características morfológicas y RAPD. El dendrograma resultante mostró un alto nivel de variación genética entre accesiones.

Por su parte, Gee-Suck *et al.* (2011), utilizando marcadores RAPD con el propósito de obtener información filogenética de la especie conocida en Corea como zarzamora coreana cultivada (KCB) y cinco especies más, concluyeron que las accesiones KCB exhiben más parentesco o cercanía genética con la especie *R. occidentalis* que con la especie *R. coreanus*.

Investigadores venezolanos como Fernández *et al.* (2010) usaron marcadores RAPD para estimar las relaciones genéticas de poblaciones de girasol, derivadas de cruces interespecíficos; Pérez-Almedida *et al.* (2010) para analizar la diversidad genética en seis especies de *Passiflora* spp. y Gutiérrez y Rincón (2011), para determinar la diversidad de una colección de germoplasma de caraota.

El objetivo de este trabajo fue la amplificación del ADN mediante marcadores RAPD en especies del género *Rubus* de los estados Táchira y Aragua, a fin de determinar la diversidad genética presente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Consistió en muestras de hojas jóvenes de plantas de las especies *Rubus glaucus*, *Rubus* spp. y *Rubus idaeus*. En el Cuadro 1 se observa la ubicación de los sitios de muestreo de los diferentes genotipos y su condición de silvestres o cultivados.

### Extracción y cuantificación de ADN genómico

Luego de la colecta en campo, las muestras se trasladaron en cava refrigerada hasta el laboratorio donde fueron lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente, colocadas en papel de aluminio y guardadas en cava a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción del ADN.

Para la extracción de ADN se pesó 0,1 g de cada muestra, se maseó en un mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron a un tubo Eppendorf. La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo de extracción del Kit PROMEGA®.

La evaluación de calidad del ADN fue realizado mediante gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis horizontal Bio-Rad Power PAC 3000, a 100 voltios y 50 miliamperios, durante media hora, utilizando Buffer TBE 0,5 X (54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5 M). En cada pozo del gel se cargaron 2  $\mu\text{l}$  de ADN más 1  $\mu\text{l}$  de Buffer de carga. La

concentración de ADN ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) y la pureza se determinaron con el equipo Spectrophotometro Nano Drop 1000. Los ADN se diluyeron hasta la concentración de  $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  con Buffer TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA). Las muestras de ADN fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN se utilizaron los marcadores moleculares RAPD: OPA02, OPA04, OPA08, OPA09, OPA10, OPA11, OPA12, OPA13, OPA14, OPA15, OPA16, OPA18, OPA20, OPB06, OPB08, OPB09, OPF13, OPF14, OPF17, OPM04, OPM10, OPW06 y OPK20. Los ciclos PCR se realizaron en un Termociclador MJ Research modelo PTC-200, siguiendo el programa consistente en una desnaturalización inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, seguido de 44 ciclos de  $93^{\circ}\text{C}$  durante 30 s, luego  $36^{\circ}\text{C}$  durante 30 s, seguido de  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min y una extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 min. Cada reacción se desarrolló en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  compuesto por 1,17  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}$  (2,5 mM); 2,23  $\mu\text{l}$  de Buffer (10X); 1,56  $\mu\text{l}$  de dNTPs (200 mM); 2,7  $\mu\text{l}$  de iniciador (0,4  $\mu\text{M}$ ); 0,3  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ); 2  $\mu\text{l}$  de ADN ( $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) y 3,46  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

### Electroforesis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular PROMEGA® de

Cuadro 1. Genotipos del género *Rubus* analizados por RAPD.

Genotipo	Especie	Latitud	Longitud	m.s.n.m.	Condición	Ubicación geográfica
1	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 08,3"	72° 20' 30"	1822	cultivado	Táchira
2	<i>R. glaucus</i>	7° 33' 11"	72° 25' 53,4"	1924	cultivado	Táchira
3	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 08,3"	72° 20' 30,2"	1822	cultivado	Táchira
4	<i>R. glaucus</i>	10° 24' 21,67"	67° 17' 21,7"	1789	cultivado	Aragua
5	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 08,3"	72° 20' 30"	1822	silvestre	Táchira
6	<i>R. glaucus</i>	7° 30' 17,3"	72° 20' 32,4"	1796	cultivado	Táchira
7	<i>Rubus</i> spp.	8° 0' 52,7"	72° 8' 26,5"	2328	silvestre	Táchira
8	<i>R. glaucus</i>	10° 24' 21,67"	67° 17' 21,7"	1789	cultivado	Aragua
9	<i>R. idaeus</i>	8° 15' 33,89"	77° 54' 42,63"	2388	silvestre	Táchira
10	<i>Rubus</i> spp.	8° 0' 52,7"	72° 8' 26,5"	2328	silvestre	Táchira

25 pb para establecer por comparación el peso molecular de los diferentes alelos. Para observar las bandas en los geles fue utilizado el equipo Gel-Doc XR Imagen Sistem Bio-Rad, software Quantity One versión 4.2.

### Análisis de los datos

Con los patrones de bandas obtenidos se construyó una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0) de banda. Para evaluar la capacidad de los marcadores en la detección de loci polimórficos fue calculado el contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) de cada marcador, propuesto (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000) con la fórmula  $PIC = 2 \sum f_i (1 - f_i)$ . Donde: PIC = PIC del marcador *i*;  $f_i$  = frecuencia de las bandas donde está presente el marcador;  $(1 - f_i)$  = frecuencia de las bandas ausentes del marcador.

Las relaciones genéticas entre los diferentes genotipos fueron estimadas usando el coeficiente de similitud de DICE de acuerdo con Laurentin (2009) y se representaron en un dendrograma obtenido con el método UPGMA usando el algoritmo pares de grupos. Fue calculado el coeficiente de correlación cofenética como medida de la confiabilidad del análisis de agrupamiento UPGMA (Rohlf y Sokal, 1981). Adicionalmente, los datos se sometieron a un

análisis de coordenadas principales (Sneath y Sokal, 1973) y analizados con los programas PAST versión 2.17 (Hammer *et al.*, 2001) e InfoStat, 2011.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede apreciarse en el Cuadro 2, los valores obtenidos para las concentraciones del ADN estuvieron entre 524 y 2253,6 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , muy superiores a los requeridos para efectuar la reacción PCR (20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ), permitiendo garantizar la amplificación del ADN en la reacción de PCR.

De los 23 iniciadores probados, se seleccionaron seis para ser utilizados en este análisis, debido a que mostraron buena resolución y bandas polimórficas. Con los iniciadores utilizados se obtuvieron 44 bandas, de las cuales 38 fueron polimórficas. El número de alelos por iniciador se ubicó entre 3 y 10 con un promedio de 7,33 alelos. El PIC promedio fue de 0,35. El valor más alto de PIC fue 0,38 obtenido para el iniciador OPW06, el cual presentó 10 alelos (Cuadro 3).

Al analizar separadamente los datos obtenidos con los iniciadores OPA18 y OPW06, se observó que los mismos permitieron separar los genotipos de las especies de *R. glaucus* provenientes del estado Aragua y *R. idaeus*, de los otros genotipos estudiados, lo cual evidenció

Cuadro 2. Características del ADN extraído de las muestras de *Rubus*.

Genotipo	Especie	ng $\mu\text{l}^{-1}$	Pureza
1	<i>Rubus glaucus</i>	524,0	1,46
2	<i>Rubus glaucus</i>	1015,3	1,69
3	<i>Rubus glaucus</i>	2217,4	1,20
4	<i>Rubus glaucus</i>	2253,6	1,13
5	<i>Rubus glaucus</i>	688,1	1,26
6	<i>Rubus glaucus</i>	1179,4	1,24
7	<i>Rubus spp.</i>	1135,2	1,09
8	<i>Rubus glaucus</i>	2004,6	1,11
9	<i>Rubus idaeus</i>	589,0	1,19
10	<i>Rubus spp.</i>	1139,0	1,12

Cuadro 3. Valores de PIC y números de bandas obtenidas para los seis iniciadores RAPD utilizados.

Iniciador	Secuencia	PIC promedio	No. de bandas
OPA10	GTGATCGCAG	0,37	9
OPA18	AGGTGACCGT	0,35	10
OPW06	TTTGGGCCCC	0,38	10
OPB09	TGGGGGACTC	0,36	3
OPM10	TCTGGCGCAC	0,35	5
OPK20	GTGTCGCGAG	0,29	7

el poder de estos marcadores para discriminar genotipos de *Rubus*. En la Figura 1, se observa el perfil de bandas obtenidas con el iniciador OPA18.

El análisis de agrupamiento mostró la formación de cuatro grupos, como se puede apreciar en el dendrograma (Figura 2). El primer grupo estuvo conformado por los genotipos 1, 2 y 3 de la especie *R. glaucus*, provenientes de los campos de productores en San Vicente de la Revancha, ubicado en el parque nacional El Tamá, municipio Junín en la zona suroeste del estado Táchira.

El segundo grupo estuvo integrado por los genotipos 5 y 6 (*R. glaucus*), igualmente provenientes de San Vicente de la Revancha, caracterizados por presentar tallos cilíndricos, hojas compuestas de tres folíolos con espinas en los tallos y en el envés de las hojas, frutos tipo drupas adheridas a un receptáculo común (al cual permanecieron adheridas cuando se cosecharon), forma cónica y color morado; también, los genotipos silvestres 7 y 10 (*Rubus* spp.) provenientes de la localidad de Los Loros en el municipio Michelena en el noroeste del estado Táchira, los cuales presentaron tallos decumbentes, angulosos, pubescentes, hojas compuestas de 3 y 5 folíolos, espinas en tallos y envés de las hojas, y frutos redondeados de color púrpura.

El tercer grupo lo integraron los genotipos 4 y 8 (*R. glaucus*) procedentes de la Colonia Tovar en el estado Aragua. Finalmente, el cuarto grupo correspondió al genotipo 9 o especie silvestre *R. idaeus*, colectada en la localidad de Pueblo

Hondo en el municipio Jáuregui al noreste del estado Táchira. Las plantas de esta especie presentaron tallos erectos, cilíndricos, con espinas, hojas compuestas de 7 u 8 folíolos, y drupas de color rojo que se desprendieron del receptáculo cuando se cosecharon (Roa, 2014).

Por otra parte, en el dendrograma se observa que las especies de *R. glaucus* (1, 2 y 3) procedentes del estado Táchira se ubicaron más cercanas a *R. idaeus* (9); esto pudiera explicarse debido a que las especies silvestres *R. idaeus* y *Rubus* spp. se consiguen en las mismas zonas de cultivo que *R. glaucus* en el estado Táchira, existiendo la posibilidad de intercambio de polen, dado que la especie es alógama, ocurriendo fijación de caracteres por el intercambio de material vegetativo clonal a través de estacas por parte de los productores de los diferentes municipios.

La similitud entre las muestras de *R. glaucus* del estado Aragua resultó más alta que entre las muestras del estado Táchira, debido, probablemente a la predominancia de una propagación de tipo asexual, tal como opinan los autores Marulanda y Márquez (2002), Graham y McNicol (1995) y Pardo *et al.* (2009), quienes concluyeron que el análisis con RAPD, permitió diferenciar las accesiones según su lugar de procedencia geográfica, aunque la variabilidad dentro de éstas no fue alta. Esto hace suponer que el modo de reproducción clonal de la especie por parte de los productores ha contribuido a mantener la similitud entre los individuos por zonas geográficas.

La separación en grupos dentro de la especie *R. glaucus* sugiere que los materiales de un mismo

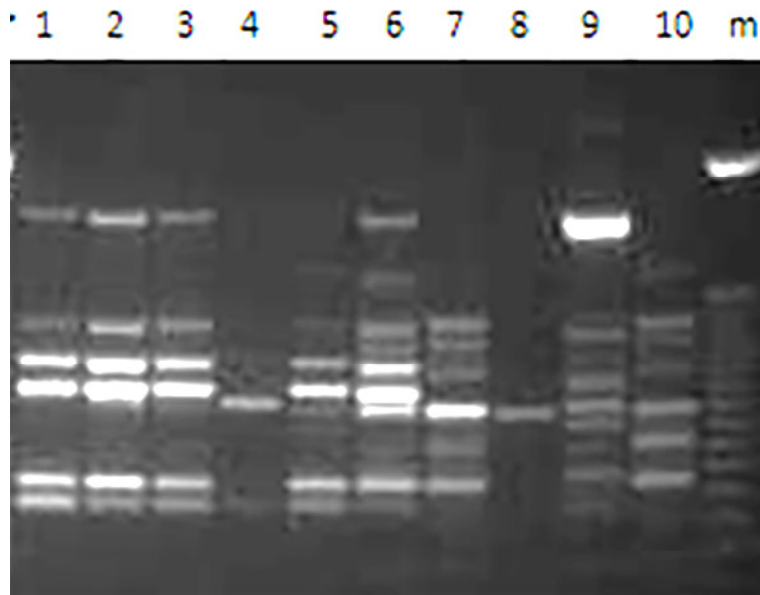


Figura 1. Perfil RAPD con el iniciador OPA18 para los 10 genotipos de *Rubus* analizados. Carriles 1, 2 y 3 = *R. glaucus* de Táchira; 4 = *R. glaucus* Colonia Tovar (Aragua); 5 y 6 = *R. glaucus* de Táchira; 7 = *Rubus* spp.; 8 = *R. glaucus* Colonia Tovar (Aragua); 9 = *R. idaeus*; y 10 = *Rubus* spp.; m = marcador.

grupo pudieran ser considerados como de un mismo pedigrí, lo cual coincide con lo señalado por Badjakov *et al.* (2006) quienes concluyeron que los marcadores RAPD fueron eficientes para discriminar materiales élite de frambuesa con un pedigrí común.

El genotipo 9 correspondiente a la especie *R. idaeus*, se separó totalmente del resto de los otros genotipos, es decir, con el análisis RAPD se logró distinguir completamente la frambuesa (*R. idaeus*) de las moras (*R. glaucus* y *Rubus* spp.), en forma similar como lo señalado por Han-Wu *et al.* (2009), y Stafne *et al.* (2003), quienes determinaron las relaciones genéticas entre genotipos de *Rubus* y distinguieron totalmente los “raspberry” (frambuesas) de los “blackberry” (moras).

Otros autores también lograron diferenciar entre *R. glaucus* y *Rubus* spp. (Marulanda y Márquez, 2001) al estudiar la diversidad genética de accesiones de estas especies. Igualmente, Salazar *et al.* (2006) demostraron el poder discriminante que tienen los marcadores moleculares RAPD para estudios de diversidad genética. Esta habilidad o poder de los

marcadores RAPD para discriminar genotipos, puede ser aprovechada para identificar y seleccionar materiales que luego podrían ser usados en cruces interespecíficos (Antonius y Nybom, 1995; Moore y Trople, 1999; Lee *et al.*, 2012; Harshman, 2012; Bushakra *et al.*, 2012).

El valor del coeficiente de correlación cofenética obtenido (0,92) en el análisis de agrupamiento, demuestra buena correspondencia entre el modelo propuesto y los datos analizados (Pardo *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

El análisis de coordenadas principales (CP) concordó con el análisis de agrupamiento UPGMA, pues separó los genotipos de *R. glaucus* (4, 8) provenientes del estado Aragua, del resto de los genotipos, así como también separó al genotipo *R. idaeus* (9) de los otros genotipos estudiados. En la Figura 3 se aprecia que el CP1 separó claramente los genotipos 1, 2 y 3 de los genotipos 4 y 8, explicando el 30,9% de la variabilidad y sugiriendo que la misma se debe a la ubicación geográfica; mientras que el CP2 explicó el 23,3% de la variabilidad debido al genotipo, pues se aprecia como separa claramente la frambuesa (genotipo 9)

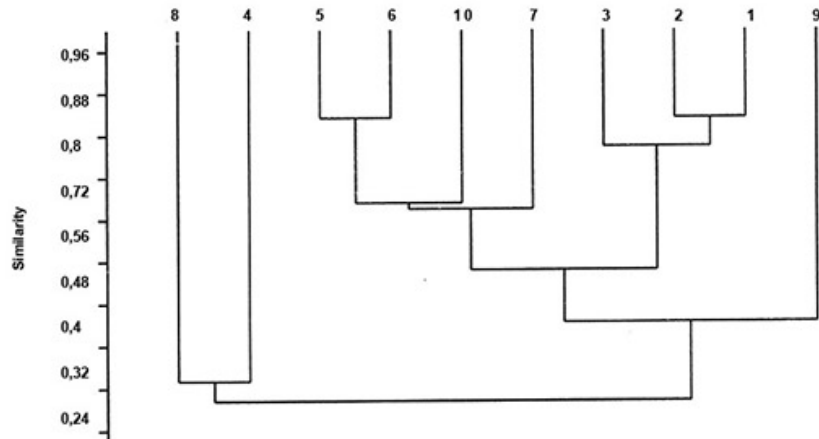


Figura 2. Dendrograma RAPD obtenido del análisis de agrupamiento UPGMA basado en el coeficiente de DICE para los 10 genotipos de *Rubus* estudiados.

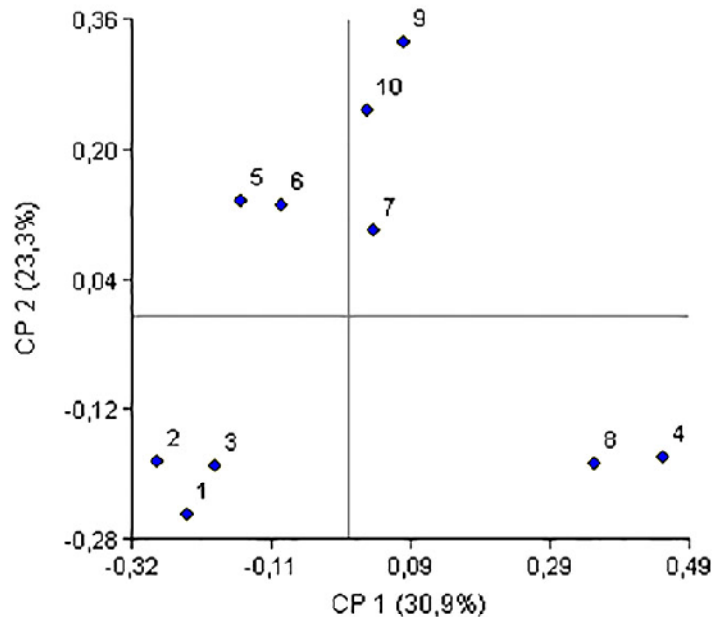


Figura 3. Análisis de coordenadas principales, utilizando el coeficiente de similitud de DICE, para los 10 genotipos de *Rubus* analizados.

de los otros materiales, mientras que el resto de los genotipos se ubicaron en posiciones intermedias. Con este análisis se explica el 54,2% de la variabilidad total.

### CONCLUSIONES

La técnica PCR utilizando los seis marcadores RAPD que resultaron polimórficos, permitió detectar la variabilidad genética de las especies evaluadas, procedentes de dos estados de

Venezuela. El marcador OPW06 tuvo el más alto valor de PIC, por lo que resultó ser el más informativo.

Tanto el análisis de agrupamiento como el de coordenadas principales permitieron la separación de la especie silvestre *R. idaeus* de las otras especies analizadas, así como separar los genotipos por su procedencia geográfica, ya que los genotipos de *R. glaucus* procedentes del estado Aragua formaron un grupo separado del colectado en el estado Táchira.

El conocimiento de las relaciones genéticas entre las especies de *Rubus* procedentes de los estados Táchira y Aragua, permitirán planificar estrategias de colecta en programas de conservación de germoplasma y cruzamientos más eficientes entre estos materiales, dependiendo de los objetivos de un programa de mejoramiento genético que pudiera incluir cruzamientos interespecíficos.

### LITERATURA CITADA

- Antonius, K. and H. Nybom. 1995. Discrimination between sexual recombination and apomixis/automixis in a *Rubus* plant breeding programme. *Hereditas*. 123:205-213.
- Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 17(2):221-242.
- Badjakov, I., E. Todorovska, V. Kondakova, R. Boicheva and A. Atanassov. 2006. Assessment the genetic diversity of bulgarian raspberry germplasm collection by Microsatellite and RAPD markers. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14(suppl. 1):61-76.
- Bushakra, J., M. Stephens, A. Atmadjaja, K. Lewers, V. Symonds, J. Udall, D. Chagne, E. Buck and S. Gardiner. 2012. Construction of black (*Rubus occidentalis*) and red (*R. idaeus*) raspberry linkage maps and their comparison to the genomes of strawberry, apple, and peach. *Theoretical and Applied Genetics*. 125:311-327.
- Fernández, H., E. Soto, E. Salazar y M. Betancourt. 2010. Análisis RAPD entre y dentro de poblaciones derivadas de girasol silvestre x cultivado. *Agronomía Tropical*. 60(3):263-269.
- Gee-Suck, E., Ch. Byung-Yeoup, R. Bandopadhyay, Y. Nam-Hee, Ch. Dong-Geun and Y. Song Joong. 2011. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 11(1):39-44.
- Graham, J. and R. McNicol. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:1128-1132.
- Gutiérrez, M., y C. Rincón. 2011. Caracterización de la variabilidad genética mediante el uso de marcadores RAPDs, de un grupo de genotipos nativos y comerciales de caraota en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 61(1):73-83.
- Hammer, Ø., D. Harper and P. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1):9. Available online: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). [Jul. 20, 2013].
- Han-Wu, Z., W. Xiao-Rong, Z. Bi-Feng, X. Wu-Feng, L. Yuan, and Ch. Qing. 2009. Genetic relationships among 17 bramble cultivars and 11 wild excellent *Rubus* germplasms from China revealed by RAPD. *Agricultural Journal*. 4:179-183.
- Harshman, J. 2012. Evaluation of raspberry (*Rubus* sp.) genotypes for postharvest quality and resistance to *Botrytis cinerea*. Tesis Masters of Science. University of Maryland. Oregon, USA. 76 p. Available online: [http://drum.lib.umd.edu/bitstream/1903/12834/1/Harshman\\_umd\\_0117N\\_13261.pdf](http://drum.lib.umd.edu/bitstream/1903/12834/1/Harshman_umd_0117N_13261.pdf). [Ago. 08, 2013].
- InfoStat. 2011. InfoStat versión 2.15 Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Laurentin, H. 2009. Data analysis for characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56:277-292.
- Lee, J., M. Dossett and Ch. Finn. 2012. *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*. 130:785-796.
- Marulanda, M. y M. Márquez. 2001. Caracterización de la diversidad genética de *Rubus glaucus* Benth con marcadores



- moleculares (RAPD). *Actualidades Biológicas*. 23(74):57-63.
- Marulanda, M. y M. Márquez. 2002. Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* mediante marcadores moleculares (RAPD). *Actualidades Biológicas*. 24(76):31-36.
- Marulanda, M., A. López and S. Aguilar. 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 7:242-252.
- Moore, P. and D. Trople. 1999. Crossability of *Rubus* species with red raspberry in the wsu breeding program. *Acta Horticulturae (International Society for Horticultural Science)*. 505:357-362. Available online: [http://www.actahort.org/books/505/505\\_48.htm](http://www.actahort.org/books/505/505_48.htm). [Jul. 07, 2013].
- Pardo, A., A. Hernández y N. Méndez. 2009. Caracterización molecular de siete clones de ajo (*Allium sativum* L.) mediante la técnica RAPD. *Bioagro*. 21(2):81-86.
- Patamsytė, J., D. Zvingila, J. Labokas, V. Baliuckas, L. Balčiūnienė, V. Kleizaitė and V. Rančelis. 2008. Study of genetic diversity in wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) germplasm collection using morphological characters and RAPD markers. *Biologija*. 54(2):66-74.
- Patamsytė, J., D. Zvingila, V. Mažonytė, V. Kleizaitė, L. Baliucka, V. Balčiūnienė and V. Rančelis. 2005. Assessment of ecological impact on genetic diversity among populations of *Rubus idaeus* L. *Biologija*. 4:24-28.
- Pérez-Almeida, I., S. Vázquez, D. Pérez, y E. Salazar. 2010. Diversidad genética en seis especies de *Passiflora* spp. utilizando RAPD. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia (LUZ)*. 27:347-359.
- Roa, S. 2014. Variabilidad genética en mora (*Rubus* spp.) presente en los estados Táchira, Mérida y Aragua y su conservación *in vitro*. Tesis doctoral. Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT). Maracay, Venezuela. 103 p.
- Rohlf, F. J. and R. R. Sokal. 1981. Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Biology*. 30:459-490.
- Roldán-Ruiz, I., E. Dendauw, A. Van Bocktaele, A. Depicke and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*. 6:125-134.
- Salazar, B., H. Laurentín, M. Dávila and M. Castillo. 2006. Reliability of the RAPD technique for germplasm analysis of sesame (*Sesamun indicum* L.) from Venezuela. *Interciencia*. 31(6):456-450.
- Sneath, P. H. A. and R. R Sokal. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman. 573 p.
- Stafne, E., J. Clark, C. Matthew, M. Pelto and J. Lindstrom. 2003. Discrimination of *Rubus* cultivars using RAPD markers and pedigree analysis. *Acta Horticulturae (International Society for Horticultural Science)*. 626:119-124. *Proc. XXVI IHC – Berry Crop Breeding* Eds. P. Hicklenton and J. Maas.