



CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE ACCESIONES DE MORERA (*Morus* SPP) EMPLEANDO MARCADORES MICROSATÉLITES

CHARACTERIZATION AND ANALYSIS OF THE GENETIC VARIABILITY OF MULBERRY (*Morus* SPP) ACCESSIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

Julián David Trochez Solarte¹

Iván Enrique Paz Narváez²

Martha Almanza Pinzón³

Ximena Ruiz Erazo⁴

¹ Magíster en Ciencias Biológicas, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
juliantrochez@unicauca.edu.co

² Doctor en Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
ipaz@unicauca.edu.co

³ Doctora en Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
malmanza@unicauca.edu.co

⁴ Doctora en Ciencias Agrarias y Agroindustriales, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
xruiz@unicauca.edu.co

Citación: Trochez, J., Paz, I., Almanza, M. y Ruiz, X. (2024). Caracterización y análisis de la variabilidad genética de accesiones de morera (*Morus* spp.) empleando marcadores microsatélites. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 15(1), 49-70.

<https://doi.org/10.22490/21456453.6555>

RESUMEN

Contextualización: el análisis de diversidad genética es fundamental para conservar y aprovechar adecuadamente los recursos genéticos, tanto vegetales como animales, además trascendental para el desarrollo de estrategias de selección y mejoramiento para la obtención de materiales promisorios.

Vacío de conocimiento: los estudios de caracterización y análisis de la variabilidad genética reportados para morera *Morus* spp en Colombia son pocos, por lo que es necesario su desarrollo a fin de proporcionar información que permita depurar y optimizar, tanto el manejo como el uso y la conservación del germoplasma disponible, aportando a la recuperación y aprovechamiento del potencial de estos recursos genéticos.

Propósito: la investigación se orientó a caracterizar genéticamente la colección de morera *Morus* spp del proyecto de sericultura caucana empleando marcadores microsatélites.

Metodología: se evaluaron 36 accesiones pertenecientes a la colección de mo-

rrera conservada en el Centro de Estudios Vegetales de La Rejoja, Universidad del Cauca, utilizando 10 microsatélites marcados con fluorescencia. Se evaluaron parámetros de diversidad y estructura genética y, adicionalmente, se determinaron relaciones genéticas mediante un Análisis de Clúster.

Resultados y conclusiones: fueron detectados 49 alelos, con un PIC medio de 0,57, indicando el empleo de marcadores polimórficos e informativos. El análisis de estructura poblacional con método bayesiano (STRUCTURE v 2.3.4) y el de agrupamiento (Neighbor-joining, PCoA) indicaron tres grupos poblacionales discretos, con una diferenciación genética significativa del 22% (AMOVA-Fst; $p < 0,001$). Destacó el hallazgo de 19 genotipos diferentes, sugiriendo la presencia de un alto número de materiales duplicados que deberán ser evaluados para posible eliminación de recursos redundantes en el banco de germoplasma.

Palabras clave: diversidad genética, estructura poblacional, germoplasma, marcador molecular, sericultura

ABSTRACT

Contextualization: The analysis of genetic diversity is essential to preserve and adequately harness genetic resources, both plant and animal, and it is transcendental for developing selection and improvement strategies to obtain promising materials.

Knowledge gap: There are few studies of characterization and analysis reported of genetic variability for mulberry *Morus* spp. in Colombia and need to be developed in order to provide information that enables refining and optimizing the management, use, and conservation of the available germplasm, contributing to the recovery and harnessing of these genetic resources' potential.

Purpose: The research aimed to genetically characterize the mulberry, *Morus* spp., collection of the Cauca region sericulture project using microsatellite markers.

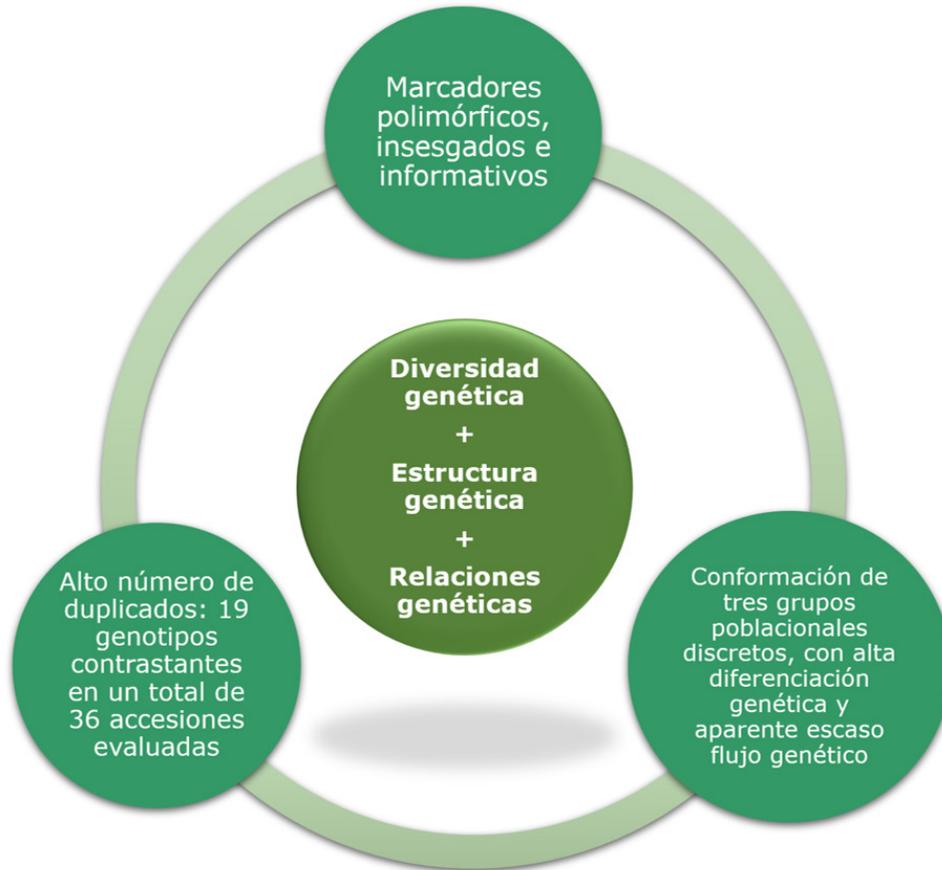
Methodology: 36 accessions belonging to the mulberry collection conserved at the Centro de Estudios Vegetales La Rejoja (Center for Plant Studies La Rejoja in

English) of Universidad del Cauca were evaluated using ten microsatellites fluorescently labeled. The diversity and genetic structure parameters were evaluated. Additionally, the genetic relationships were determined through a cluster analysis.

Results and conclusions: 49 alleles were detected, with a mean PIC of 0.57, indicating the use of polymorphic and informative markers. The population structure analysis with the Bayesian (STRUCTURE v 2.3.4) and grouping methods (Neighbor-joining and PCoA) indicated three discrete population groups with significant genetic differentiation of 22% (AMOVA - Fst; $p < 0.001$). It highlighted the finding of nineteen different genotypes, suggesting the presence of a high number of duplicate materials that will have to be evaluated for the possible elimination of redundant resources in the germplasm bank.

Keywords: genetic diversity, population structure, germplasm, molecular marker, sericulture

RESUMEN GRÁFICO



Fuente: autores.

1. INTRODUCCIÓN

La morera *Morus* spp. es un árbol caducifolio, leñoso, perenne y de crecimiento rápido, perteneciente a la familia Moraceae, con variedades y especies cultivadas representativas como *M. alba*, *M. inga* y *M. indica*, que representan un componente vital de la sericultura por ser

la única fuente de alimento para *B. mori* (Sohn, 2014). Actualmente se distribuye en más de 70 países y también se utiliza como forraje verde o en forma de ensilaje o deshidratada para la alimentación de animales de granja o para producción de frutos, usos ornamentales y medicinales

(Vijayan *et al.*, 2011). En la última década del siglo XX, los países de Centroamérica y el Caribe han trabajado en la introducción y multiplicación de las especies de morera oriundas de la zona asiática. Esta creciente importancia económica para el trópico, ha influido en los esfuerzos para coleccionar, estudiar y conservar el germoplasma del género *Morus* (Tikader y Vijayan, 2010; Mathithumilan *et al.*, 2013), considerando que son fundamentales para desarrollar materiales con alta producción de forraje, resistentes a enfermedades y tolerantes a diferentes condiciones ambientales. China dispone de más de 2600 accesiones de morera, India con 1120, Japón con 1502, Corea con 615 y Bulgaria con 140 aproximadamente, además otros países cuentan con pequeñas colecciones (Tikader y Vijayan, 2010; Vijayan *et al.*, 2011). Existen aproximadamente 68 especies dentro del género *Morus*, pero las accesiones en bancos de germoplasma pertenecen principalmente a las especies *M. alba*, *M. bombycis*, *M. indica* y *M. latifolia*; es decir, la mayor parte de los parientes silvestres no han sido colectados, estudiados y conservados, por lo tanto, estos materiales representan una fuente potencial de recursos para ampliar la diversidad genética disponible e incorporar características de interés a los bancos de germoplasma, especialmente *M. serrata* Roxb. y *M. macroura* Miq, que en los análisis de diversidad han demostrado una marcada diferenciación genética y presenta relaciones distantes con las especies más empleadas del género *Morus* (Tika-

der y Vijayan, 2010; Mathithumilan *et al.*, 2013).

El proyecto de Sericultura Caucana en el año 2016, estableció un banco de germoplasma de *Morus spp* en el Centro de Estudios Vegetales (CEV) de la Universidad del Cauca (Vereda “La Rejoya”, Popayán), con accesiones donadas por sericultores de la región; no obstante, no contaban con información sobre el nombre, origen, descriptores o datos de pasaporte. En este contexto, el desconocimiento de los recursos genéticos representa un obstáculo para el aprovechamiento del potencial agronómico de estos materiales y sería evidente por la utilización, casi exclusiva, de la variedad Kanva 2 para la alimentación del gusano de seda en el Cauca. Por esta razón, la efectividad con la que se puede manejar y gestionar el germoplasma de morera dependerá de la información genética disponible. En este sentido, los marcadores moleculares son herramientas que proporcionan datos más exactos, amplios y detallados que los marcadores fenotípicos (morfológicos y bioquímicos), puesto que no están influenciados por el ambiente, por lo tanto, la naturaleza de la información que proporcionan es idónea para caracterizar y discriminar genéticamente los materiales de estudio (Cornejo *et al.*, 2014; Angelo *et al.*, 2013).

La investigación tuvo como objetivo caracterizar y analizar la variabilidad genética de la colección de morera *Morus spp* del proyecto de sericultura caucana empleando marcadores microsatélites.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de las muestras se realizó en el Centro de Estudios Vegetales (CEV) adscrito a la Universidad del Cauca, ubicado en la vereda La Rejoja, a 7 km del nororiente de la cabecera municipal, en las coordenadas 2° 29' 55,6" Latitud Norte, 76° 34' 58,1" Longitud Oeste, a una altura de 1800 msnm, temperatura promedio de 18°C y precipitación promedio anual de 1750 mm (Vivas y Morales, 2005). Posteriormente, los métodos y protocolos de laboratorio fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Material vegetal: se evaluaron 36 accesiones de *Morus* spp (Tabla 1). Para la extracción de ADN genómico se utilizó tejido foliar de hojas jóvenes, pulverizado con nitrógeno líquido, utilizando el Kit de extracción NucleoSpin® Plant II mini, siguiendo las instrucciones del fabricante (MACHEREY-NAGEL). Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -20 °C. La calidad del ADN obtenido (concentración, pureza e integridad) se verificó mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa (0,8%) con tinción Gel-Red.

Tabla 1. Accesiones que conforman la colección de *Morus* spp.

Accesión	Código análisis	Variedad/Nombre común	Taxón
UPSM001	1	Ichinose	<i>Morus alba</i>
UPSM002	2	Rosa Fonseca	<i>Morus alba</i>
UPSM005	5	SN	<i>Morus</i>
UPSM006	6	S13	<i>Morus</i>
UPSM007	7	S9	<i>Morus</i>
UPSM008	8	SINJD A1	<i>Morus</i>
UPSM009	9	S3	<i>Morus</i>
UPSM011	11	Miura	<i>Morus alba</i>
UPSM012	12	SN	<i>Morus</i>
UPSM013	13	Italiana	<i>Morus</i>
UPSM014	14	Kanva 1	<i>Morus indica</i>

UPSM015	15	S3	
UPSM016	16	S9	<i>Morus</i>
UPSM017	17	Kanva 2	<i>Morus indica</i>
UPSM018	18	SN	<i>Morus</i>
UPSM019	19	Kaayanpong	<i>Morus</i>
UPSM020	20	Calabresa	<i>Morus alba</i>
UPSM021	21	Subong pong	<i>Morus alba</i>
UPSM022	22	S13	<i>Morus</i>
UPSM023	23	Tai Song	<i>Morus formosien-</i> <i>sis</i>
UPSM024	24	S18	<i>Morus</i>
UPSM026	26	Miura	<i>Morus alba</i>
UPSM027	27	Sin Ed (AA-2)	<i>Morus</i>
UPSM028	28	Nacional	<i>Morus</i>
UPSM029	29	Taixon	<i>Morus</i>
UPSM030	30	Chirosa Cauca	<i>Morus</i>
UPSM031	31	Kanva 1	<i>Morus indica</i>
UPSM032	32	Miura	<i>Morus alba</i>
UPSM033	33	Nacional	<i>Morus</i>
UPSM034	34	Nacional	<i>Morus</i>
Bulgaria1	B1	SN	<i>Morus</i>
Bulgaria2	B2	SN	<i>Morus</i>
Bulgaria3	B3	SN	<i>Morus</i>
Bulgaria4	B4	SN	<i>Morus</i>
Kanva2	K2	Kanva 2	<i>Morus indica</i>

*SN: sin nombre.

Fuente: autores.

Genotipificación de los microsatélites: la investigación manejó ocho microsatélites (Tabla 2), diseñados específicamente

para su utilización en *Morus spp*. El cocktail de amplificación incluyó 1-4 ng/ μ l de ADN, 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μ M de cada oligonucleótido, 5 μ l

de tampón de PCR (5x) y 0,625 U de Taq polimerasa (OneTaq® DNA Polymerase, NEB), para un volumen final de 25 µl por muestra. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad PTC-100 con oligonucleótidos marcados con fluorescencia, utilizando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, temperatura de alineamiento para cada cebador (53-64 °C, Tabla 2) durante 30 s, extensión a 68

°C durante 30 s; y una extensión final a 68 °C durante 10 min. La longitud de los productos de la PCR (amplicones) se determinó mediante el análisis de los fragmentos marcados con fluorescencia en un secuenciador automático de electroforesis capilar (Applied Biosystems 3730XL, GeneScan 500 LIZ Size Standard, Macrogen, Corea). Las lecturas fueron procesadas y el tamaño de los alelos identificados se asignó utilizando el software Geneious v7.0 (Kearse et al., 2012).

Tabla 2. Microsatélites (SSR) usados para evaluar la diversidad genética en la colección de *Morus* spp.

SSR	Primers (5'-----3')	Tm (°C) *	Rango (pb)	Motivo repetitivo	Marcaje*	Fuente
MuISTR1	F gccgtgtaccagtggagtttgca	55	160-220	(GT-T) ₆ +(GTT) ₄	PET	Aggarwal <i>et al.</i> (2004).
	R tgaccgtttcttccact-ttacctaatg					
MuISTR2	F cgtggggccttaggctgagtagagg	55	158-210	(GTT) ₁₁	VIC	Aggarwal <i>et al.</i> (2004).
	R caccaccactacttctcttct-tccag					
MuISTR3	F gggttgggtagatgggcttat-gtta	53	107-398	(GA) ₃₃	6-FAM	Aggarwal <i>et al.</i> (2004).
	R ccctattaacttttgggtcacctcta					
MuISTR4	F ggtcaagcgcctcagagaaaag	59	110-161	(GAA) ₆	6-FAM	Aggarwal <i>et al.</i> (2004).
	R ggtgcagaggatgaaagatgaggt					
MuISTR5	F cccctgcaatgccccttttc	64	130-190	(CCA) ₈	PET	Aggarwal <i>et al.</i> (2004).
	R tgggagcaggcaggaagattc					
MuISTR6	F tccttaggttttggggtctgttcat	55	110-190	(GT) ₁₅	6-FAM	Aggarwal <i>et al.</i> (2004).
	R cctcattctccttctact-tattgttg					

SS04	F cgagggaggatgaggagc	55	187-250	(TG) ₂₇	VIC	Zhao <i>et al.</i> (2005).
	R cacattcatgcaccctcctata					
Mu13SSR95	F gatcatcgtgccaataagcc	53	209	AG	VIC	Mathithu- milan <i>et al.</i> (2013).
	R taagagctgagaggggaagc					

* **Tm**: temperatura de alineamiento, € Diana fluorescente presente en los primeros para marcar las ampliaciones. **Fuente**: autores.

Análisis estadístico

La diversidad genética fue estimada mediante el número de alelos observados (Na), el número efectivo de alelos (Ne), la heterocigosidad observada y esperada (Ho y He) y el índice de fijación (Fis) utilizando el programa GenAlEx v. 6.5 (Peakall y Smouse, 2006; 2012). Para determinar el carácter informativo de los microsatélites y la población total, se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) y el rango de tamaño (pb) utilizando el programa CERVUS v. 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y el desequilibrio de ligamiento (LD) entre todos los pares de loci se evaluó utilizando Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), mediante el método de Cadenas de Markov para 10.000 permutaciones y, así, determinar si las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas con cada microsatélite se ajustaban a diferentes modelos de la genética de poblaciones.

La estructura poblacional fue analizada con el método Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007; Hubisz *et al.*, 2009). Teniendo en

cuenta, que el origen de los cultivares modernos de morera incluyen hibridaciones intra e interespecíficas, se adoptó el modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas para la identificación del número más probable de poblaciones (K) en que está dividida la colección de *Morus* y los valores de pertenencia de cada accesión a esas K poblaciones (Matriz Q). El programa fue ejecutado con un burn-in de 10.000, seguido de 50.000 Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC), analizando de 1 a 10 como el número posible de K, con diez iteraciones o repeticiones por cada K. La elección del número más probable de K se realizó basándose en el mayor valor logarítmico de la verosimilitud (LnP(K)) utilizando el método desarrollado por Evanno *et al.* (2005), implementado en Structure Harvester (Earl y Vonholdt, 2012). Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA - Fst) para determinar el grado de diferenciación genética; la significancia estadística se estableció con los índices F: Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (Fst), Coeficiente de endogamia entre poblaciones (Fis) y Coeficiente de endogamia total (Fit), a partir

de un bootstrap de 1000 réplicas utilizando el software GenAlEx v. 6.5 (Peakall y Smouse, 2006; 2012).

El agrupamiento de las accesiones se observó mediante el dendograma construido a partir de una matriz de disimilaridad usando el algoritmo Neighbor-joining con las distancias de Sokal y Michener y valores de bootstrap de 1000 réplicas para evaluar la solidez del árbol, utilizando el

programa DARwin v. 6.0 (Perrier y Jacquemoud, 2015); posteriormente, fue editado con el programa Figtree v. 1.4.2 (Rambaut, 2014) para obtener el árbol consenso. Paralelamente, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) en GenAlEx v. 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), a partir de las distancias genéticas corregidas de Nei y de esta manera, obtener una representación gráfica de los resultados y visualizar la diferenciación de las accesiones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética y Características de los microsatélites

Los ocho *loci* microsatélites amplificados, generaron 49 alelos en total, el mayor número lo presentó el marcador MulSTR3 seguido de Mul3SSR95. El rango se ubicó entre 4 y 11 con un promedio de 6,125 alelos por locus (Tabla 3). El número efectivo de alelos (N_e) fue inferior al número observado de alelos (N_a) en todos los microsatélites, indicando que la distribución de las frecuencias alélicas no es del todo equitativa dentro de los mismos, es decir, existen alelos en cada marcador con una frecuencia superior, en mayor o menor grado, a la de los demás. Este tipo de distribución puede indicar la presencia de alelos raros o exclusivos y sugerir que un material o población se ha mantenido genéticamente aislado (Slatkin, 1985), y, en consecuencia, pueden ser importantes para discriminar o diferenciar materiales entre sí; igualmente, según los trabajos

de Brown y Briggs (1991) y Frankel *et al.* (1995), los alelos exclusivos mostrarían la posible presencia de fenotipos adaptados a condiciones ambientales específicas o de interés productivo.

El PIC alcanzó un valor promedio de 0,57 con un rango entre 0,171 y 0,859 (Tabla 3), donde los marcadores MulSTR3 y Mul3SSR95 presentaron el mayor poder discriminatorio. De acuerdo con la escala propuesta por Botstein *et al.* (1980) y lo expresado por Laos (2022) y Guerra *et al.*, (2018), los seis marcadores que presentaron valores de $PIC > 0,5$ fueron altamente discriminantes e informativos; MulSTR1 fue moderadamente informativo ($0,25 < PIC < 0,5$) al presentar el menor número de alelos efectivos y observados; por su parte, SS04 fue ligeramente informativo ($PIC < 0,25$), por ende, con locus de baja diversidad, aspecto que permite inferir la baja capacidad discriminante del marcador en la colección analizada.

Resultados similares fueron obtenidos en estudios que han analizado una cantidad semejante de materiales (entre 27 y 53 aproximadamente), en los cuales el número de alelos por locus y el PIC presentaron valores entre 5 a 7 y 0,4 a 0,7 respectivamente (García *et al.*, 2019; Krishnan *et al.*, 2014; Wangari *et al.*, 2013; Wani *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2005). Orhan *et al.* (2020) también lograron resultados similares, reportando un número de alelos y PIC promedio de 5.19 y 0.61 respectivamente; aunque, a diferencia del presente estudio, el marcador SS04 fue altamente informativo, posiblemente, porque incluyeron un

mayor número de genotipos, 73 en total, que abarcaban 3 especies diferentes (*M. nigra*, *M. rubra* y *M. alba*). Aggarwal *et al.* (2004), por su parte, obtuvieron 18 alelos por locus, mientras que, Krishnan *et al.* (2014) reportaron 215 alelos en total; en este sentido, los valores individuales de cada locus SSR analizado en el presente estudio fueron inferiores al número de alelos y el PIC reportados previamente (Zhao *et al.*, 2005; García *et al.*, 2019), efecto ocasionado probablemente, por la presencia de un alto número de genotipos duplicados en la colección.

Tabla 3. Características de los ocho microsatélites (SSR) en 36 accesiones de *Morus spp.*

SSR	N	Na	Ne	PIC	Ho	He	F _{is}
MuISTR3	36	11	7,831	0,859	0,750	0,885	0,140
MuI3SSR95	34	10	5,883	0,811	0,529	0,842	0,362
MuISTR4	35	4	2,707	0,558	0,657	0,640	-0,042
SS04	36	4	1,219	0,171	0,167	0,182	0,073
MuISTR5	36	5	3,269	0,636	0,972	0,704	-0,401
MuISTR6	36	6	3,767	0,693	0,722	0,745	0,017
MuISTR2	36	4	2,642	0,543	0,500	0,630	0,196
MuISTR1	36	5	1,419	0,281	0,222	0,299	0,247
□±SE*	35,625±0,26	6,125±0,99	3,592±0,80	0,569±0,09	0,565±0,10	0,616±0,09	0,074±0,08

*Gran promedio ± Error estándar entre loci SSR, N: número de individuos muestreados, Na: número de alelos, Ne: número efectivo de alelos, PIC: contenido de información polimórfica, Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, Fis: índice de fijación.

Fuente: autores.

Las frecuencias genotípicas de los microsatélites no se ajustaron significativamente ($P < 0,05$) al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW); en la mayoría de los casos, se

observaron valores positivos del índice de fijación (Fis) indicando déficit de heterocigotos o eventos pasados de cruza entre materiales cercanos, aumentando

la endogamia y disminuyendo la heterocigosidad (Herrera *et al.*, 2021; Suarez *et al.* 2016); al respecto, Ellegren y Galtier (2016), señalan que se aumentaría la probabilidad de perder alelos para la siguiente generación, llevando a la pérdida progresiva de diversidad genética. Además, en la prueba de desequilibrio de ligamiento (LD, Figura 1), la mayoría de los loci o microsatélites presentaron una asociación altamente significativa entre sí ($P < 0,05$). En este contexto, los resultados

de las pruebas de HW y LD comprobarían que los materiales analizados no se comportan como una población ideal con reproducción aleatoria; por el contrario, representan una población estructurada, producto posiblemente de los procesos de selección, que normalmente operan en el mejoramiento genético de cultivares para desarrollar características productivas y biológicas particulares (Dempewolf *et al.*, 2017; Loo, 2011).

Locus	#	0	1	2	3	4	5	6	7
0		*	+	+	+	+	+	+	+
1		+	*	+	-	+	+	+	+
2		+	+	*	-	+	+	-	-
3		+	-	-	*	+	+	+	+
4		+	+	+	+	*	+	+	+
5		+	+	+	+	+	*	+	+
6		+	+	-	+	+	+	*	+
7		+	+	-	+	+	+	+	*

Figura 1. Resultados de la prueba de desequilibrio de ligamiento para todos los pares de microsatélites ($P=0,05$). Los símbolos “+” indican parejas de loci SSR significativamente ligados, mientras el símbolo “-” indica lo contrario, no ligados de forma significativa. Codificación de loci en la prueba: Loci 0: MulSTR3, loci 1: Mul3SSR95, loci 2: MulSTR4, loci 3: SS04, loci 4: MulSTR5, loci 5: MulSTR6, loci 6: MulSTR2, loci 7: MulSTR1.

Fuente: autores.

Estructura poblacional y relaciones genéticas

Con el fin de estimar el número aproximado de poblaciones en que se estructuran las accesiones se empleó inicialmente

el valor máximo estimado del logaritmo de la probabilidad ($\ln P(K)$). Sin embargo, no alcanzó un valor que se mantuviera estable, por el contrario siguió aumentando y en cierto punto presentó una variación inestable junto con un aumento conside-

nable en las varianzas, especialmente después de $K=6$ (Figura 2a). Por esta razón, se proyectó que el número más probable de poblaciones debía ser inferior a $K=6$. Adicionalmente, el método de Evanno *et al.* (2005), que calcula el segundo orden de cambio de probabilidad (Δk), es más sensible que el anterior para detectar el número

de poblaciones más probable bajo las circunstancias anteriormente descritas. Adoptando dicho enfoque, Δk alcanzó su máximo valor en $K = 3$ (Figura 2b), indicando que la colección completa de morera estaría estructurada en tres grupos poblacionales diferentes.

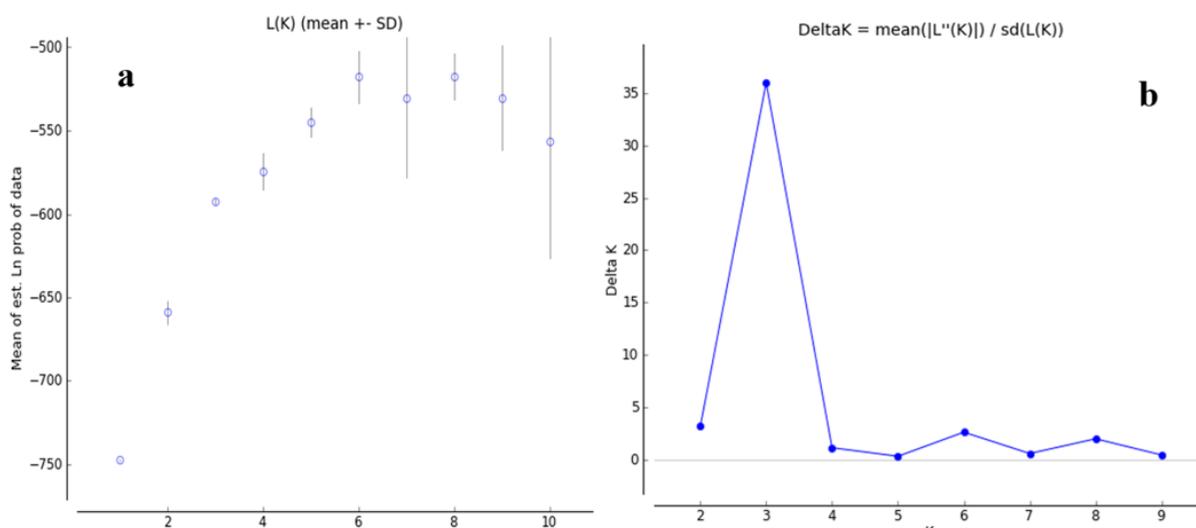


Figura 2. Selección del número más probable de subpoblaciones (K) para las accesiones evaluadas. a) Valores medios de $\text{LnP}(K)$ para las 10 iteraciones independientes de cada K. b) Gráfico de los valores de Δk (delta K) para cada K, basado en el cambio de segundo orden de la función de verosimilitud (Evanno *et al.*, 2005).

Fuente: autores.

¿El dendrograma (Figura 3a y 3b) y el PCoA (Figura 4) permitieron identificar tres agrupaciones, las cuales coinciden con los grupos poblacionales reconocidos anteriormente. Esto implicaría la presencia de grupos poblacionales discretos, es decir, representarían poblaciones o grupos aislados entre sí, con un germoplas-

ma propio y único y escaso flujo genético con los demás, excepto por posibles eventos de introgresión o hibridación entre materiales contrastantes, como se puede observar en los genotipos B3, 34, 33, 28 y 18; los cuales presentan un valor de pertenencia menos dominante a determinada

población y más distribuido entre dos o tres de los grupos.

En el clúster, para el código de color azul se destaca la agrupación de materiales provenientes de Bulgaria (etiquetados con una B inicial), denotando que su origen geográfico representaría una relación genética más estrecha. El código rojo concentra accesiones que en el análisis de estructura poblacional presentaron valores de pertenencia menos dominantes, y podrían catalogarse como materiales híbridos. La distribución de los códigos de color sugiere una relación cercana entre los grupos azul y rojo, e indicaría que el rojo está compuesto por materiales de origen chino o japonés y tendrían asociación directa con materiales que fueron introducidos en Europa desde el medio o lejano oriente por rutas marítimas o terrestres, según las vías de diseminación de la morera en el mundo propuestas por García *et al.* (2019). Finalmente, el clúster verde se destaca por incluir a Kanva 2, el cultivar más empleado en departamento del Cauca para la alimentación del gusano de seda *Bombyx mori* (Ruiz, 2022; Viteche, 2015), y estaría representando por materiales tropicales originados en el sur de la India, con alto número de posibles duplicados, como puede observarse en el dendrograma (Figura 3a) y en el PCoA (Figura 4). El cultivar Kanva 2 (K2) tendría como posibles duplicados, las accesiones

5, 14, 17 y 31; situación similar ocurriría entre las accesiones 19, 21, 27 y 32, que podrían representar un genotipo. Con relación al genotipo 15, podría representar dos materiales diferentes y distantes al estar incluido en diferentes grupos, por lo cual fueron etiquetados como a y b.

Krishnan *et al.* (2014) al analizar 36 genotipos, incluyendo materiales silvestres, encontraron que estos materiales se dividirían en cuatro grupos poblacionales, contexto que no es posible encontrar en Colombia, por no ser el centro de origen del género *Morus*. Sin embargo, García *et al.* (2019) y Orhan *et al.* (2020) también indicaron la presencia de tres clústeres en su análisis de agrupamiento, señalando que las colecciones de germoplasma de morera muestran una tendencia a estar organizadas genéticamente en tres grupos poblacionales. En el caso de Krishnan *et al.* (2014), es relevante destacar la inclusión de Kanva 2, igual que en el presente estudio; según sus hallazgos, estaría agrupada con los cultivares y variedades desarrolladas en el sur de la India. Al respecto, Guruprasad (2011) indica que las variedades desarrolladas en la India en la década de los 70 y principios de los 80, procedían de un estrecho acervo genético de los cultivares Mysore Local, Kousen (variedad japonesa), Kanva-2 (cultivar tradicional) y Sujanpur-5.

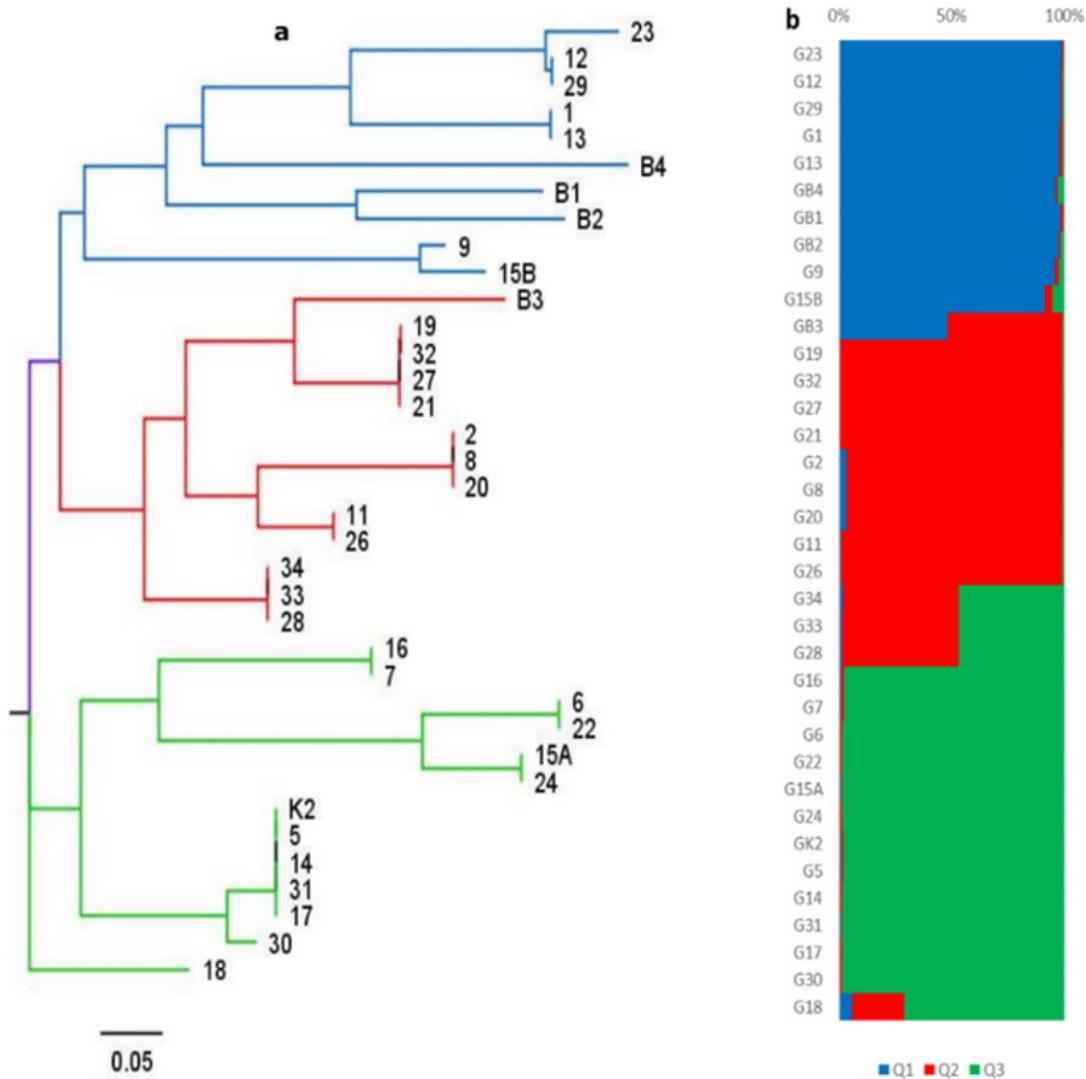


Figura 3. Análisis de agrupamiento y estructura genética. a) Dendrograma demostrando las relaciones genéticas entre 36 accesiones de la colección de *Morus* spp. con ocho loci SSR, empleando el método Neighbor-joining, las ramas presentan colores para diferenciar las tres agrupaciones identificadas. b) Estructura genética de las 36 accesiones de *Morus* spp. basado en ocho loci SSR generados por el programa Structure utilizando los modelos de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas. Los tres grupos poblacionales identificados (K) están representadas por colores distintos, que coinciden con las agrupaciones y orden descendente del dendrograma. Cada fila representa una accesión que puede fraccionarse en segmentos, cuyo tamaño es proporcional al porcentaje o valor de pertenencia estimado de cada accesión a cada uno de los tres grupos poblacionales (Q1, Q2 y Q3). Fuente: autores.

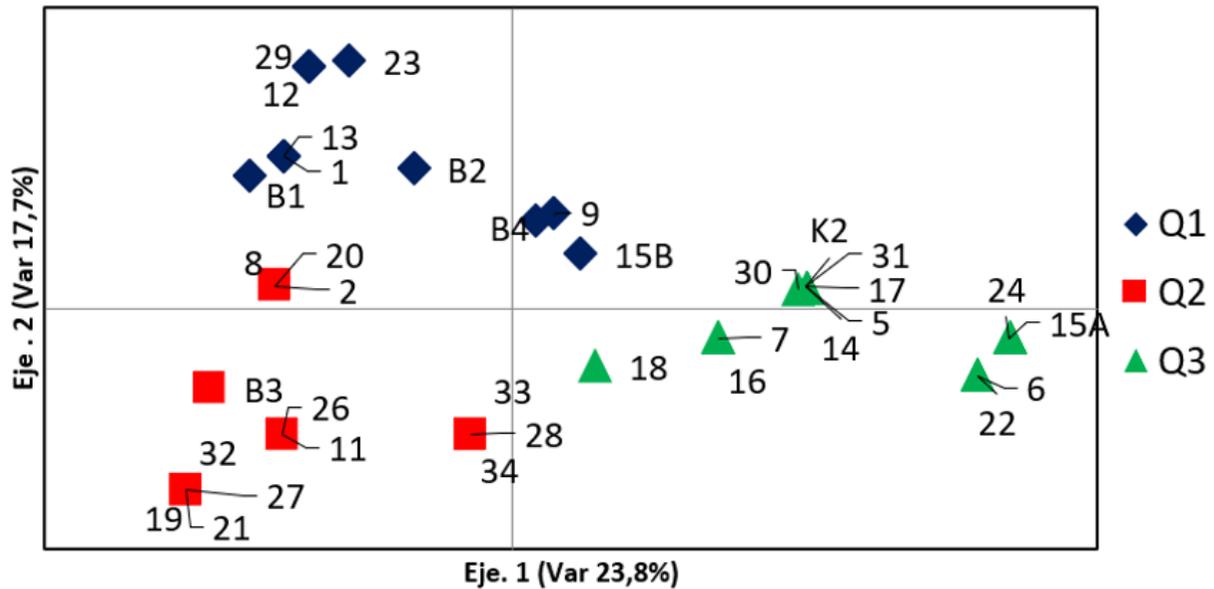


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las 36 accesiones de la colección de *Morus* spp. La gráfica fue realizada a partir de la distancia genotípica implementada en GenALEx v. 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Las accesiones están identificadas con un símbolo y color distintos, que coinciden con las agrupaciones observadas en el análisis de agrupamiento y estructura genética. Entre paréntesis se indica el porcentaje de la variabilidad (Var) de cada Eje de coordenadas. Fuente: autores.

El AMOVA (Tabla 4) indica que el 78% de la variación genética se presenta dentro de los individuos con un Fit (0,167) significativo; mientras que, el 22% de la variación se encuentra entre grupos poblacionales, con un coeficiente F_{st} (0,203) significativo (Tabla 5), resultados que sugieren un origen común, es decir, podrían derivarse de una o pocas variedades que se han sometido a procesos de domesticación temprana, como programas de selección artificial que les lleva a perder su diversidad genética (García *et al.*, 2020; Rauf *et al.*, 2010); no obstante, factores como el modo de cultivo, el flujo genético por agentes

polinizadores o el intercambio de material podrían contribuir a la diferenciación genética (Chacón *et al.*, 2016). También se destaca el sistema de reproducción, puesto que la morera es polinizada principalmente por el viento, siendo mayoritaria la polinización cruzada (Wangari *et al.*, 2013; Datta *et al.*, 2002), dando como resultado, materiales o cultivares híbridos con alta heterocigosidad a nivel de sus loci (Krishnan *et al.*, 2014), que se mantendría estable en el tiempo debido a la propagación vegetativa. Resultados similares fueron reportados por Krishnan *et al.* (2014) del 83% y 17% respectivamente, aunque la

variación entre poblaciones en el presente estudio fue ligeramente superior, posiblemente, por la presencia de los duplicados,

que disminuyeron la variación entre individuos a cero, aumentando en proporción las otras fuentes de variación.

Tabla 4. AMOVA-Fst entre las 36 accesiones de *Morus spp.* Los materiales fueron organizados en los tres grupos poblacionales identificados en el análisis de agrupamiento y estructura genética

Fuente de variación	GI	SC	CM	Est. Var.	% Total
Entre poblaciones	2	33,431	16,716	0,622	22%
Entre individuos	33	62,208	1,885	0,000	0%
Dentro de individuos	36	80,500	2,236	2,236	78%
Total	71	176,139		2,858	100%

gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrados medios, Est. Var: varianza estimada.

Fuente: autores.

Tabla 5. Significancia estadística del AMOVA-Fst mediante índices F

Estadístico F	Valor	P(rand >= data)
Fst	0,232	0,001
Fis	-0,085	0,964
Fit	0,167	0,001

Significancia estadística establecida con 1000 permutaciones aleatorias.

Fuente: autores.

4. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que los marcadores fueron polimórficos, inesgados e informativos sobre la diversidad, la estructura y las relaciones genéticas de las accesiones. Particularmente, destacan seis microsatélites altamente informativos (PIC>0,5). Los análisis indicarían la posi-

ble presencia de duplicados, dada la obtención de 19 accesiones diferentes en un total de 36 evaluadas. Por lo tanto, es necesario contrastar los resultados con una caracterización morfológica y productiva para identificar un comportamiento biológico o productivo de interés y determinar

si deben eliminarse o conservarse como líneas o clones. También, se recomienda la introducción de nuevos genotipos para aumentar la variabilidad. El análisis de agrupamiento y estructura reveló que las 36 accesiones conforman tres grupos poblacionales discretos con diferenciación genética y aparentemente bajo flujo genético. Lo que sugiere presencia de

materiales genéticamente contrastantes que podrían utilizarse en futuras evaluaciones para el desarrollo de programas de selección y generación de cultivares élite, que beneficien, tanto la actividad serícola como otras áreas agropecuarias que requieran fuentes de alimentación de alta calidad nutricional.

CONTRIBUCIÓN DE LA AUTORÍA

Julián Trochez: metodología, investigación, análisis de datos, conceptualización, escritura, revisión y borrador original. **Iván Paz:** análisis de datos, revisión y edi-

ción. **Martha Almanza:** análisis de datos, revisión y edición. **Ximena Ruiz:** análisis de datos, escritura, revisión y edición.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca por la financiación del proyecto ID4972; al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira por su apoyo técnico en el desarrollo de la

investigación; al grupo de investigación SISINPRO por la asesoría y el apoyo científico; al Proyecto de Sericultura Caucana por permitir realizar los muestreos del material vegetal que con forman la colección de morera.

LITERATURA CITADA

Aggarwal, R., Udaykumar, D., Hendre, P., Sarkar, A., and Singh, L. (2004). Isolation and characterization of six novel microsatellite markers for mulberry (*Morus indica*). *Molecular Ecology Resources*, 4(3), 477-479. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00718.x>

Angelo, S., Sasson, A., Costarini, V., Aguilar, V., Ortiz, M., Sandoval, J., Colina, S., Fuguet, G., Verdú, R., and Garboza, L. (2013). Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. *FAO*.

- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., and Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314-331.
- Brown, A., and Briggs, J. (1991). Sampling Strategies for Genetic Variation in Ex Situ Collections of Endangered Plant Species. In, *Genetics and Conservation of Rare Plants* (pp. 99-119). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195064292.003.0007>
- Chacón, M., Sánchez Y., and Barrero, L. (2016). Genetic structure of a Colombian cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) collection by means of microsatellite markers. *Agronomía Colombiana* 34(1), 5-16. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1.52960>
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., and Rocha, M.G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. [1 ed.], *Semarnat, INECC y UAM*, 1, 1-75.
- Datta, R.K., Sarkar, A., Rao, P.R., and Singhvi, N.R. (2002). *Utilization of mulberry as animal fodder in India*. Mulberry for Animal Production: Proceedings of an Electronic Conference Carried Out Between May and August 2000, (183).
- Dempewolf, H., Baute, G., Anderson, J., Kilian, B., Smith, C. and Guarino, L. (2017). Past and future use of wild relatives in crop breeding. *Crop Science*, 57(3), 1070-1082. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0885>
- Earl, D.A. and Vonholdt, B.M. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Ellegren, H., and Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 17, 422-433. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., and Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574-578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-

1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
- Frankel, O.H., Brown, A. H., and Burdon, J.J. (1995). *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press.
- García, B., González, H., Martínez, C., Cenis, L.J., Pérez, C.D., Martínez, Y., and Martínez, P. (2019). The molecular characterization of an extended mulberry germplasm by SSR markers. *Genetika*, 51(2), 389-403. <https://doi.org/10.2298/GENSR1902389G>
- García, M., López, A., Álvarez, S., Guarnizo, P., Tirado, I., Postillos, M., Araujo, I., and Siles, M. (2020). Análisis de diversidad genética de *Physalis peruviana* L. procedente de tres regiones de Perú utilizando marcadores microsatélites. *Bioteología Vegetal*, 20(4), 326-337.
- Guerra, M., Ruiz R., and Pardo, E. (2018). Diversidad genética de *Mangifera indica* (Anacardiaceae) en Valencia, Córdoba, Colombia, usando marcadores microsatélites. *Acta Botánica Mexicana* 124, 105-116. <https://doi.org/10.21829/abm124.2018.1285>
- Guruprasad, R.R. (2011). *Development of core collection of mulberry (Morus spp.) germplasm by molecular marker aided analysis*. [Thesis Doctor of Philosophy]. University of Mysore, India.
- Herrera, J., Berdúo, J., Ruiz, J., Kalousova, M., and Melgar, S. (2021). Informe final: Estudio de diversidad genética del cedro nativo guatemalteco y establecimiento de una colección núcleo *in vitro*. Proyecto B21-2020. Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA), Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J.K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1322-1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., and Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., and Durán, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Krishnan, R.R., Naik, V.G., Ramesh, S.R., and Qadri, S.M. (2014). Microsatellite marker analysis reveals the events of the introduction and spread of cultivated mulberry in the Indian subcontinent. *Plant Genetic Resources*, 12(1), 129-139. <https://doi.org/10.1017/S1479262113000415>
- Laos, A. (2022). *Análisis de la diversidad genética de las poblaciones silvestres del cedro*

- de altura Cedrela angustifolia* utilizando marcadores moleculares. [Tesis Licenciatura]. Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología. Lima (Perú).
- Loo, J. (2011). *Manual de genética de la conservación. Principios aplicados para la conservación de la diversidad biológica*. CONAFOR.
- Mathithumilan, B., Kadam, N., Biradar, J., Reddy, S., Ankaiah, M., Narayanan, M., Makarla, U., Khurana, P., and Sreeman, S. (2013). Development and characterization of microsatellite markers for *Morus* spp. and assessment of their transferability to other closely related species. *BMC Plant Biology*, 13(194), 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-194>
- Orhan, E., Meleksen, A., Eydurán, S., and Ercisli, S. (2020). Molecular characterization of mulberry genotypes and species in Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(2), 549-557. <https://doi.org/10.15835/nbha48211928>
- Peakall, R., and Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537 - 2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Peakall, R., and Smouse, P. (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Perrier, X., and Jacquemoud, J. (2015). *DARwin software: Dissimilarity analysis and representation for windows* (6.0). CIRAD. <http://darwin.cirad.fr/>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Rambaut A. (2014). *FigTree, ver. 1.4.2*. Program distributed by the autor. University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rauf, S., Teixeira da Silva, J., Khan, A., and Naveed, A. (2010). Consequences of plant breeding on genetic diversity. *Intl J Plant Breeding*, 4, 1-21.
- Ruiz, X. (2022). *Selección de Parentales de Gusano de Seda Bombyx Mori para el Programa de Mejoramiento Genético Serícola del Cauca*. [Tesis Doctoral]. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39(1), 53-65. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb04079.x>
- Sohn, K.W. (2014). *Technical manual for tropical sericulture: practical technology to produce silkworm eggs and cocoons in the tropics*. Korea International Cooperation Agency (KOICA).

- Suárez, D., Herrera, J., Lara, A., and Parra, G. 2016. Diversidad y origen genético de poblaciones introducidas de bagre de canal (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818), en el centro occidental de México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(3), 525-534. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue3-fulltext-11>
- Tikader, A., and Vijayan, K. (2010). Assessment of biodiversity and strategies for conservation of genetic resources in mulberry (*Morus* spp.). *Tree and Forest Biodiversity. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 4, 15-27.
- Vijayan, K., Saratchandra, B., and Teixeira da Silva, J. A. (2011). Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). *Scientia Horticulturae*, 128(4), 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.11.012>
- Viteche, A. (2015). *Ruta de transición agroecológica de unidades serícolas en el municipio de Timbío Cauca*. [Tesis pregrado]. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.
- Vivas, N., and Morales, S. (2005). Evaluación agronómica y producción de grano de diez accesiones de guandul (*Cajanus cajan*) en la meseta de Popayán-Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 3(1), 36-40.
- Wangari, N.P., Gacheri, K.M., Theophilus, M.M., and Lucas, N. (2013). Use of SSR markers for genetic diversity studies in mulberry accessions grown in Kenya. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(3), 38-44. <https://doi.org/10.5897/IJBM-BR11.057>
- Wani, S.A., Bhat, M.A., Malik, G.N., Zaki, F.A., Mir, M.R., Wani, N., and Bhat, K.M. (2013). Genetic diversity and relationship assessment among mulberry (*Morus* spp.) genotypes by simple sequence repeat (SSR) marker profile. *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3181-3187.
- Zhao, W., Miao, X., Jia, S., Pan, Y., and Huang, Y. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. *Plant Science*, 168(2), 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.09.020>

Conflicto de intereses
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.



Licencia de Creative Commons

Revista de Investigación Agraria y Ambiental is licensed under a Creative Commons Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional License.