



U.M.S.N.H



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA DE FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUAREZ"

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISICOQUIMICA Y NIVELES DE
PLOIDÍA EN ZARZAMORAS (*Rubus* subgénero *Eubatus*)
SILVESTRES DE MICHOACÁN**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ING. MA. LUISA RUEDA BERBER

TUTOR:

Ph.D JOSÉ LÓPEZ MEDINA

Uruapan, Michoacán. México, Marzo 2017

DEDICATORIAS

De manera muy especial a mis padres

Jesus Rueda y María Luisa Berber

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Caracterización morfológica, fisicoquímica y niveles de ploidia en zarzamoras (*Rubus* subgénero *Eubatus*) silvestres de Michoacán" presentado por la ING. Ma. Luba Rueda Berber, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

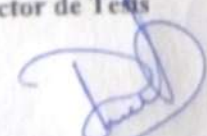
ATENTAMENTE

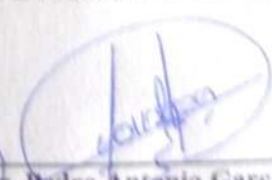
Morelia, Michoacán, a 07 de marzo de 2017

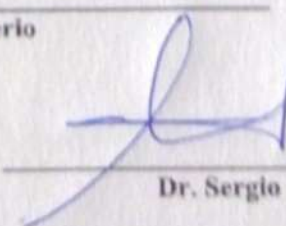
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dr. José López Medina
Director de Tesis


Dra. Ma. Del Carmen Rocha Granados


Dra. Patricia Delgado Valerio


Dr. Pedro Antonio García Saucedo


Dr. Sergio Segura Ledesma

ÍNDICE	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	3
2.1. Origen de la zarzamora.....	4
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.1.2 Características morfológicas de la zarzamora.....	5
2.1.3 Importancia de la zarzamora.....	13
2.1.4 Producción de la zarzamora.....	13
2.1.5 Usos de la zarzamora.....	13
2.1.6 Propiedades nutricionales.....	14
2.2 Descripción de las especies de <i>Rubus</i> en Michoacán.....	14
2.3 Identificación por caracterización morfológica.....	20
2.4 Métodos estadísticos multivariados en la caracterización morfológica.....	21
2.5. Polifenoles.....	22
2.6. Cuantificación de polifenoles.....	27
2.7 Niveles de ploidía.....	28
2.8 Citometría de flujo.....	29
III. Materiales y Métodos.....	32
IV. Resultados y Discusión.....	50
V. Conclusiones.....	74
VI. Referencias.....	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Subgéneros que integran al género <i>Rubus</i>	5
2. Clasificación de los polifenoles según su ruta biosintética.....	24
3. Localización de las especies de <i>Rubus</i> en las zonas aledañas a Uruapan, Michoacán.....	33
4. Lista de descriptores de UPOV, abreviación y forma de evaluación.....	34
5. Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componentes principales en la caracterización de <i>Rubus</i>	54
6. Valores propios de los descriptores más discriminantes.....	58
7. Proporción de la varianza explicada por cada variable original sobre los cuatro componentes principales en la caracterización de <i>Rubus</i>	60
8. Contenido μg EAG/ μg en especies de <i>Rubus</i>	65
9. Parámetros fisicoquímicos de frutos de <i>Rubus</i> spp.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Tipos de tallos principales de <i>Rubus</i>	7
2. Formas de la sección transversal del tallo de <i>Rubus</i>	7
3. Formas de la lámina del foliolo terminal de las hojas del tallo principal	8
4. Tipos de indumentos en el género <i>Rubus</i>	9
5. Tipos de espinas en el género <i>Rubus</i>	9
6. Formas de la inflorescencia en el género <i>Rubus</i>	10
7. Planta de <i>R. adenotrichus</i> A. rama con hoja y inflorescencia, B. flor vista de frente.....	16
	24
8. Compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina.....	
9. Principales funciones de los polifenoles en las plantas.....	26
10. Diagrama de la metodología utilizada para la preparación de muestras para la determinación del contenido en ADN por citometría flujo.....	31
11. Esquema general de trabajo de investigación.....	31
12. Mapa que muestra los sitios de colecta de las zarzamoras silvestres.	33
13. Material vegetal de <i>Rubus</i> sp.	34
14. Ilustraciones del hábito de crecimiento de la planta.....	38
15. Ilustraciones del tamaño de la espina.....	39
16. Ilustraciones de la forma de la espina en la hoja.....	39
17. Ilustraciones de las vellosidades en la hojas.....	40
18. Ilustraciones del tipo de hoja.....	41

19.	Ilustraciones de la longitud del peciolo.....	41
20.	Ilustración de la longitud del fruto.....	42
21.	Ilustración de la forma del fruto.....	43
22.	Esquema de los procedimientos del análisis de la cuantificación de polifenoles, parámetros fisicoquímicos y niveles de ploídia de <i>Rubus</i>	45
23.	Muestras de los diferentes tratamientos para la cuantificación de polifenoles.....	46
24.	Frutos de <i>Rubus coriifolius</i>	46
25.	Esquema del análisis de ploidía.....	48
26.	Descripción de las especies clasificadas.....	50
27.	Valores de variación de los diferentes factores en el análisis de componentes principales.....	51
28.	Distribución de las variables originales de las acepciones del primero y segundo componente.....	54
29.	Plano de distribución de las diferentes especies de <i>Rubus</i> sp. ...	60
30.	Comparación de medias del contenido μg EAG/ μg obtenido en el análisis de varianza de las diferentes especies de <i>Rubus</i> sp.	61
31.	Parámetros fisicoquímicos de <i>Rubus</i> sp.	64
32.	Contenido de ADN/pg en las especies de <i>Rubus</i> spp.....	66
33.	Histograma de las especies evaluadas, relativo a la intensidad fluorescente.....	67
34.	Correlaciones de las variables cuantitativas evaluadas $r > 0.60$ y $p < 0.05$	73

RESUMEN

Rubus es uno de los géneros de plantas más complejos a nivel taxonómico debido, a la diversidad en los niveles de poliploidía, la presencia de apomixis y la hibridación entre especies, lo cual genera cierta confusión de los límites entre una especie y otra. Por otra parte, existe gran diversidad entre especies en el contenido de compuestos bioactivos, aspecto que se puede aprovechar, para el mejoramiento genético. El presente trabajo tuvo como objetivo principal hacer una caracterización morfológica, fisicoquímica y niveles de ploídia de las principales zarzamoras silvestres localizadas en zonas cercanas a Uruapan, Michoacán. Para ello, en nueve sitios diferentes se colectaron plantas, las cuales fueron propagadas en condiciones de invernadero. De estos materiales, se hizo una descripción morfológica utilizando como referencia los descriptores de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV); también se evaluaron variables tanto cualitativas como cuantitativas. La variabilidad morfológica se determinó mediante un análisis componentes principales. En los análisis fisicoquímicos, se cuantificaron parámetros como contenido de fenoles, solidos solubles totales y acidez titulable, entre otros. Con el fin de determinar los niveles de ploidia, se determinó el contenido de ADN mediante citometria de flujo. De los resultados obtenidos, se observó que los cinco primeros factores explicaron el 70.23 % de la variabilidad total, sobresaliendo el primer factor, que por sí solo explicó el 23.55 %. Las explicaciones para los factores 2, 3, 4 y 5 fueron del 22.36 %, 10.81 %, 6.92% y 6.57 %, respectivamente. Se identificaron cinco especies diferentes: *Rubus cymosus* Rydb, *R. humistratus* Steud, *R. coriifolius*, *R. sapidus* Schltdl y *R. adenotrichos* Schltdl. En general, los caracteres (variables) más discriminantes en estas cinco especies fueron: fructificación en la rama del año en curso; diámetro de la flor; pigmentación antocianina, longitud, distribución predominante de las ramas y sección transversal en rama latente; número predominante de foliolos en hojas; tamaño de la drupa en frutos; pigmentación

antocianica en brote joven; época de la brotación de la yema foliar; profundidad de las incisiones en el foliolo, y color del pétalo en la flor. Así mismo, *R. adenotrichos* y *R. cymosus* mostraron variabilidad entre ellas mismas en los diferentes sitios de colecta. Con respecto al análisis fisicoquímico, se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles. Este aspecto, *R. adenotrichus* presentó el mayor contenido de ácido gálico (24.64 ± 2.6 mg); *R. coriifolius* presentó la mayor cantidad de sólidos solubles totales (13.6 °Brix). Los niveles de ploidía variaron de diploides a tetraploides ($2x = 14$, $3x = 21$ y $4x = 32$) entre las cinco especies evaluadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que existe amplia variabilidad tanto de caracteres morfológicos como fisicoquímicos entre las diferentes especies de *Rubus*; esto puede servir de apoyo para fortalecer un programa de mejoramiento genético.

Palabras clave: Caracterización, poliploidia, componentes principales, bioactivos

ABSTRACT

Rubus is one of the most complex plant genera at the taxonomic level due, among other factors, to diversity on ploidy levels, apomixis, ploidy levels, and hybridization among species; these factors cause some confusion among the species. On the other hand, there is also great diversity among the species related with bioactive compounds; however, this aspect can be useful for plant breeding purposes. On this aspect, the present work had as a principal objective to make both, a morphological and physicochemical characterization, and to determine ploidy levels as well, on the main wild blackberry species found close to Uruapan, Michoacan, Mexico. To do this, plants of the different species were collected from nine different locations, and then they were propagated under greenhouse conditions. From these material, a morphological description was made by using the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) descriptors; qualitative and quantitative variables were evaluated as well. Morphological variability was determined through a principal components analysis as well. For the physicochemical analysis, parameters such as phenol-, total soluble solids- and titrable acidity-content were also evaluated. In order to assess ploidy level, DNA content was determined through flow cytometry. As results, it was observed that the first four factors explained 70.23% of total variability; from this, 23.55% corresponded to the first factor; then, 22.36%, 10.81%, 6.92% and 6.57% corresponded to factors 2, 3, 4 and 5, respectively. Five different *Rubus* species were identified; these were: *R. cymosus*, *R. humistratus* Steud, *R. coriifolius*, *R. sapidus* Schltdl., and *R. adenotrichos* Schltdl. The most discriminated characters (variables) on these five species were: fructification of current's year branches; flower diameter; anthocyanin coloration; length, predominant distribution, and cross-section on latent branches; predominant number of leaflets on leaves; size of the drupe fruits; anthocyanin coloration in young shoot; time of the sprouting of the leaf bud; depth of the incisions in the leaflet; color of the petal in the flower; depth of the incisions in the leaflet; and color of the petal in the flower. Also, *R. adenotrichos* and *R. cymosus* showed variability among them. Also, *R.*

adenotrichos and *R. cymosus* showed variability among them in the different sites where they were collected. With respect to the physicochemical analysis, significant differences were observed on phenol contents; on this aspect, *R. adenotrichus* showed the highest Gallic acid content (24.64 ± 2.6 mg.); *R. coriifolius* also showed the highest total soluble solids content (13.6 °Brix). Ploidy level varied from diploid to tetraploid ($2x = 14$, $3x = 21$ y $4x = 32$) among the five evaluated species. According to these results, it is concluded that there exist wide variability of both morphological and physicochemical characteristics among the different *Rubus* species that were here evaluated. These findings could be helpful to support a fruit breeding program.

Key words: Characterization, Polyploidy, principal components, bioactives

I INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Rosaceae, *Rubus* es uno de los géneros de plantas más complejos a nivel taxonómico debido, entre otros factores, a la diversidad en los niveles de poliploidía, la presencia de apomixis y la hibridación entre especies, e incluso entre subgéneros, lo cual genera confusión sobre los límites entre una especie y otra (Alice y Campbell, 1999; Finn, 2008; Weber, 1996). Las zarzamoras (*Rubus* subgénero *Rubus* [antes *Eubatus*]) forman parte de los frutales que conforman la amplia gama de recursos fitogenéticos de México y otras regiones del mundo (Cancino-Escalante *et al.*, 2012).

En el Estado de Michoacán se han identificado ocho especies silvestres de zarzamora, entre ellas a *Rubus adenotrichos* Schltdl., *R. humistratus* Steud., *R. cymosus* Rydb., *R. pringlei* Rydb., *R. pumila* Focke, y *R. sapidus* Schltdl.; de éstas, solamente *R. cymosus* y *R. adenotrichos* son claramente distinguibles, pues los análisis morfológicos revelan entremezclados entre las distintas especies (Segura *et al.*, 2012). *R. adenotrichos* y *R. humistratus*, así como otras especies (*R. trichomallus*, *R. umifolius*, *R. alnifolius* y *R. scandens*) ya habían sido previamente indentificadas en una región del sur de la meseta Purépecha.

El género *Rubus* se caracteriza por su variabilidad morfológica, pues incluye especies arbustivas y leñosas, generalmente tetraploides, pequeñas herbáceas o postradas y con láminas foliares reducidas (Clark *et al.*, 2007). Usualmente, las especies de *Rubus* presentan variabilidad morfológica y genética debido la poliploidía (Cancino-Escalante *et al.*, 2012). Además de que puede ocurrir hibridación entre las diferentes especies (Marulanda *et al.*, 2007).

La colección, caracterización y evaluación del germoplasma vegetal es tarea prioritaria para la conservación, mejoramiento y obtención de materiales

sobresalientes con características productivas (Moreno *et al.* 2011). La caracterización debe efectuarse en diferentes órganos de la planta, además de estados fisiológicos y tipos de caracteres, debiendo éstos ser analizados en conjunto para darles la misma importancia (González-Andrés, 2001).

Entre las características observadas en materiales silvestres Michoacanos, destaca la resistencia a cenicilla vellosa, enfermedad ocasionada por el hongo *Peronospora sparsa* y que es uno de los mayores problemas que afecta severamente la producción de las zarzamora comerciales (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009); también destacan el alto contenido de antocianinas y fenoles (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010).

Es posible que entre los diferentes materiales silvestres haya también otros caracteres de interés que se puedan explotar en programas de mejoramiento genético para la generación de variedades comerciales. En el presente trabajo se propuso con los objetivos siguientes:

Objetivo general

Realizar una caracterización morfológica, fisicoquímica y los niveles de ploidía en poblaciones silvestres de zarzamora presentes en zonas aledañas a Uruapan Michoacán

Objetivos específicos

Hacer una colecta de materiales silvestres de zarzamora en Michoacán y ubicar los sitios de los mismos mediante sistemas de información geográfica.

Realizar una caracterización morfológica en los materiales colectados

Evaluar la cuantificación de polifenoles y análisis parámetros fisicoquímicos en frutos de zarzamoras.

Determinar los niveles de ploidía de las plantas de zarzamora

Hipótesis

Las zarzamoras silvestres de Michoacán presentan diversidad genética, poliploidia, hibridación entre las especies y un elevado grado de entrecruzamiento, generando individuos que pueden ser catalogados como nuevas especies.

Justificación

Dentro de la familia Rosaceae, *Rubus* es uno de los géneros de plantas más complejos a nivel taxonómico debido, entre otros factores, a la diversidad en los niveles de poliploidía, la presencia de apomixis y la hibridación entre especies, e incluso entre subgéneros, lo cual genera confusión sobre los límites entre una especie y otra. Las zarzamoras silvestres son ricas en compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y ácidos fenólicos. Numerosos estudios han mostrado que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes una gran diversidad de funciones biológicas como antidiabéticas, anticancerígenas, antiinflamatorias etc. Se permitirán conocer las características morfológicas más discriminantes, el contenido de polifenoles y niveles de ploidía de las poblaciones nativas de zarzamoras ampliando el conocimiento de las especies ubicadas en zonas aledañas a Uruapan Michoacán y clasificar las estrategias de conservación, usos de germoplasma en programas de mejoramiento genético, que mejoraran en gran medida la producción de zarzamora. Por ello es importante generar nuevas variedades de zarzamora con mejores atributos agronómicos, fisicoquímicos que los materiales existentes

II. Revisión de literatura

2.1 Origen zarzamora

Las zarzamoras han sido recolectadas de materiales silvestres desde hace al menos 2,000 años. Se tiene referencia de que la domesticación de materiales siempreverdes se inició en el siglo XVII, pero previo a ello ya se utilizaban con propósito medicinales y para cercados (Galleta y Violette, 1989). En Norteamérica la deforestación ocasionada por la agricultura facilitó que las zarzamoras nativas se esparcieran, lo que también favoreció su hibridación; pero su cultivo se inició entre 1850 y 1860; para 1867 tenían registrados 18 cultivares (Galleta y Violette, 1989).

En el mundo existen 750 especies del género *Rubus* y, de acuerdo con Rzedowski y Calderón de Rzedowsky (2005). Por otro lado, este género, particularmente *Rubus*, es muy complejo en cuanto a los niveles de ploídia, los cuales varían desde diploides ($2n = 14$) hasta tetradecaploides ($2n = 98$) (Clark *et al.*, 2007; Moore y Skirvin, 1990; Ourecky, 1975).

Específicamente en el estado de Michoacán, en los últimos 40 años se han realizado trabajos que han contribuido a la taxonomía de este género; ejemplo de ello, es el trabajo de Cruz 1997, al coleccionar diversos morfotipos en la parte norte de Uruapan, logró identificar seis especies: *R. adenotrichus*, *R. humistratus*, *R. trichumallus*, *R. ulmifolius* y *R. alnifolium*; sin embargo, Cruz indican que la información necesaria para la identificación aún es escasa. Por su parte, Mora Macías (2009) estableció siete sitios de colecta, dentro de los cuales se identificaron y colectaron diez materiales silvestres. En colaboración con el Dr. Rzedowski se identificaron botánicamente las especies de *R. adenotrichus*, *R. coriifolius* y *R. pringlei*.

2.1.1 Clasificación taxonómica

La zarzamora pertenece al género *Rubus* y presenta variabilidad en especies debido, principalmente, a la frecuente reproducción apomítica e hibridación (Rzedowski y Calderón, 2005)

Reino: Plantae

Superphylum: Tracheophyta

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Rosoidae

Género: *Rubus*

Especie: *Rubus* sp.

(CONABIO, 2014)

Cuadro 1. Subgéneros que integran al género *Rubus* (Focke, 1914)

Subgénero	Número de especies	Subgénero	Número de especies
<i>Anaplobatus</i> (Focke) Focke	6	<i>Dalibardastrum</i> Focke	4
<i>Chamaebatus</i> (Focke) Focke	5	<i>Ideobatus</i> (Focke) Focke	117 (9 secciones)
<i>Chamaemorus</i> (Hill) Focke	1	<i>Lampobatus</i> Focke	10
<i>Comaropsis</i> (Rich.) Focke	2	<i>Malanchobatus</i> (Focke) Focke	115 (7 secciones)
<i>Cylactis</i> (Raf.) Focke	14 (4 series)	<i>Orobatus</i> Focke	19
<i>Dalibarda</i> (L.) Focke	5	<i>Eubatus</i> (Focke)	132 (6 secciones)

2.1.2 Características morfológicas de zarzamoras

La zarzamora es un arbusto que presenta tallos leñosos, con gran flexibilidad, semitrepadores, angulosos y provistos de espinas cortas y curvadas, con presencia de pequeñas glándulas rojas; mide de uno a cuatro metros de altura; son tallos bianuales que durante el primer año se desarrollan y en el segundo florecen y luego mueren; la planta posee hojas compuestas por cinco folíolos ovalados y lanceolados, con dientes irregulares, estipulados, pecíolos pubescentes, espinosos y nervios bien marcados, de un brillante verde oscuro por el haz y por el envés con pilosidad blanquecina; las flores son hermafroditas y autofértiles, con cinco pétalos y cinco sépalos y numerosos pistilos; al final de las ramas se presentan en racimos de tres o más flores de hasta tres centímetros de diámetro, de color blanco o rosado y se desarrollan en los tallos de dos años el fruto es un agregado constituido por pequeños frutos conocidos como drupelas, cada uno con una semilla, reunidas alrededor de un eje común, por lo cual al fruto se le nombra polidrupa, con tamaño de uno a dos centímetros de largo; las drupelas suelen ser carnosas, de color verde a medida que maduran se tornan de color rojizo hasta llegar a negro muy intenso y brillante, ; y cuando están bien maduras, éstas tienen un agradable sabor dulce (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

2.1.3 Tallo principal

El tallo principal (Figura 1) puede ser: suberecto, arqueado (siendo al principio erecto hasta 1 – 2 m y luego curvado), arqueado-postrado (erecto hasta 0.5 m) y decumbente; la forma de la sección transversal varía desde casi circular a angulosa y, en este caso, las caras puede tener planas, más o menos convexas o circular-angulosa o cóncavas (Figura 2); normalmente estos tallos son más angulosos y de caras cóncavas en la punta, más redondeados en la base; el tamaño del diámetro es de 3-5 mm para las formas más finas, y hasta 9-12 o más mm en las más gruesas (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

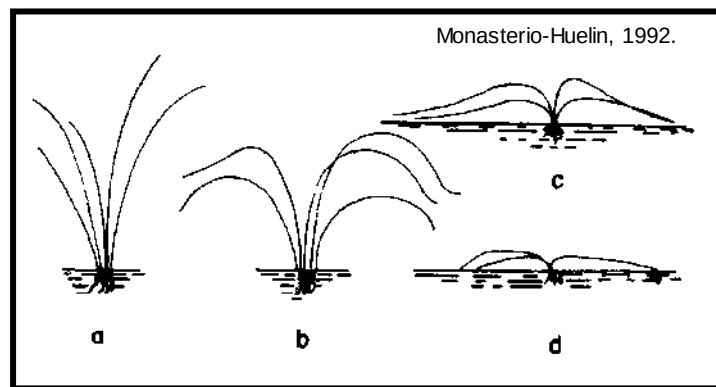


Figura 1. Tipos de tallos principales en *Rubus*: a) suberecto, b) arqueado, c) arqueado-postrado y d) decumbente.

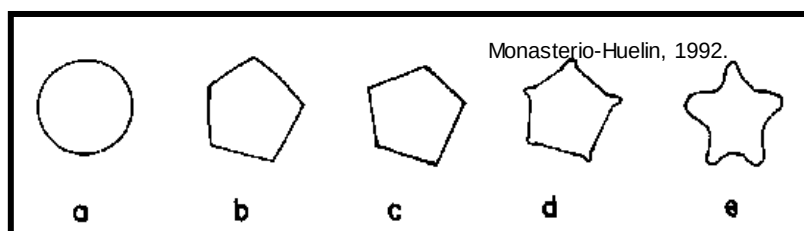


Figura 2. Formas de la sección transversal del tallo principal en *Rubus*: a) circular, b) circular-angulosa, c) angulosa de caras planas, d) angulosas e) angulosas de caras cóncavas.

2.1.4 Hoja

Las hojas son compuestas, estipuladas, pecioladas y con el margen de la lámina dentada; el número de folíolos, en las hojas del tallo principal, varía entre 3-5 o 7, aunque todas las especies tienen tendencia a presentar como más frecuente un número con 3 o 5 folíolos; las hojas pentafoiliadas son palmaticompuestas; las pinnaticompuestas sólo se forman en *Rubus idaeus* y sus híbridos; aquellas con 7 folíolos son raras y sólo encuentran en *R. idaeus* (Monasterio-Huelin, 1992: Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). En la inflorescencia normalmente las hojas son simples en la parte superior y de 2 a 3, o hasta 5 folíolos en la inferior; tanto en el haz como en el envés pueden aparecer pelos simples, excepto para *R. canescens* y *R. idaeus*, que los tiene estrellados y simples estrellados en el envés (Monasterio-Huelin, 1992: Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

La forma de la lámina del folíolo terminal es una característica taxonómica importante y se mantiene más o menos constante dentro de una misma especie. Ésta presenta diferentes formas, como ovada, suborbicular, rómbica, trasovada y oval (Figura 3); el ápice puede ser mucronada o subulada y en la base cuneiforme, redondeada, truncada o cordada; las estípulas son concrescentes con el tallo o con el pecíolo y varían en su forma: lanceolada, linear-lanceolada y filamentosa (Monasterio-Huelin, 1992).

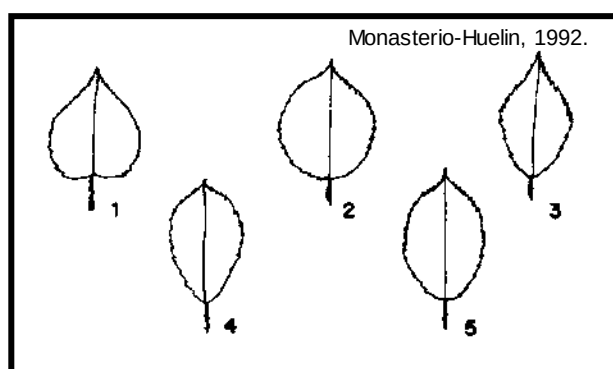


Figura 3. Formas de la lámina del folíolo terminal en las hojas del tallo principal. ÷ 1: ovado, 2: suborbicular, 3: rómbica 3, 4: transovada y 5: oval.

2.1.5 *Indumento*

Se denomina como indumento a la superficie de las distintas partes de la planta que pertenecen al género *Rubus*; éste se encuentran recubierto con pelos, glándulas y acúleos, cuyo número y forma suele variar de unas especies a otras, lo que también puede causar modificación de factores ecológicos como humedad y exposición solar (Monasterio-Huelin, 1992).

Los pelos son de dos tipos: simples y estrellados (Figura 4). Los primeros son más largos (0.4 a 1.5 mm) que los segundos y pueden presentarse aislados o en fascículo (agrupados en la base), mientras que os estrellados son más cortos (0.1 a 0.3 mm) y están unidos en la base en apariencia y de estrella (Monasterio-Huelin, 1992).

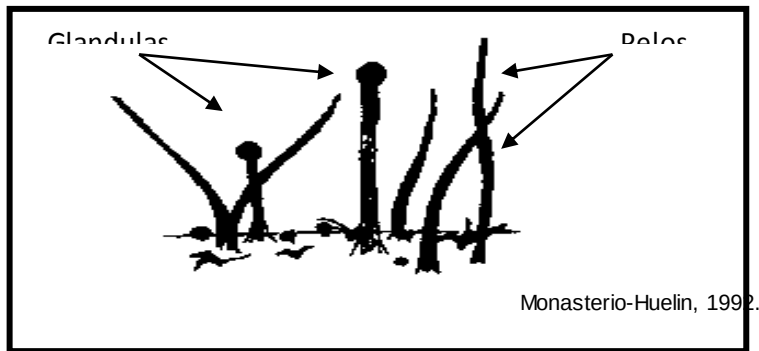


Figura 4. Tipos de indumentos en el género *Rubus*:
Pelos simples, aislados y en fascículos, estrellados y
glándulas pedunculadas y sésiles.

Las espinas (Figura 5) varían en tamaño, pudiendo variar de rectas a curvadas y en dirección patentes o inclinadas; otras características en cuanto a la forma, es la anchura de la base, la cual puede ser estrecha y entonces la espina presentará forma de punzón, o más o menos ancha y, en este caso, si se estrecha poco a poco hacia la punta, formará lo que se conoce como "espina subulada", o, si lo hace de forma abrupta, será "espina mucronada"; aunque generalmente el color coincide con el del tallo principal, pero a veces puede ser, parcial (en la base) o total (Monasterio-Huelin, 1992).

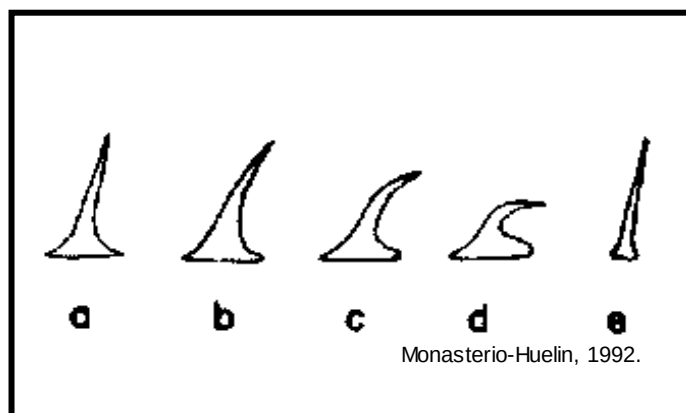


Figura 5. Tipos de espinas en *Rubus*: a) recta e
inclinada b) moderadamente curvada c) curvada d)
falciforme e) forma punzón.

2.1.6 Inflorescencia

La inflorescencia en el género *Rubus* es compuesta y de tipo panícula, no se expresa constante ni en el tamaño ni en el número de flores dentro de una misma especie (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). En función de que los pedúnculos sean más o menos largos, la panícula puede ser ancha por arriba, con los pedúnculos superiores largos (piramidal truncada), estrecha por arriba y más ancha por abajo (piramidal), o con todos los pedúnculos más o menos de la misma longitud (cilíndrica) (Figura 6) (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). No es raro que las ramas superiores presenten los frutos ya desarrollados, o si por algún motivo éstos hayan sido cortadas, se desarrollen ramas laterales desde la zona axilar de las hojas inferiores de la inflorescencia (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). La parte apical se afila en algunas especies, mientras que otras tienen hojas casi hasta el ápice; es también frecuente que las ramas superiores sean de tipo bracteiforme. Casi todas las especies tienen glándulas sentadas sobre el eje, pedúnculo y pedicelos que, en caso de que la pilosidad sea abundante, quedan escondidas entre los pelos; estas partes son aculeadas con la excepción de formas inermes que se desarrollan en algunas especies y como ejemplo esta *Rubus ulmifolius* (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

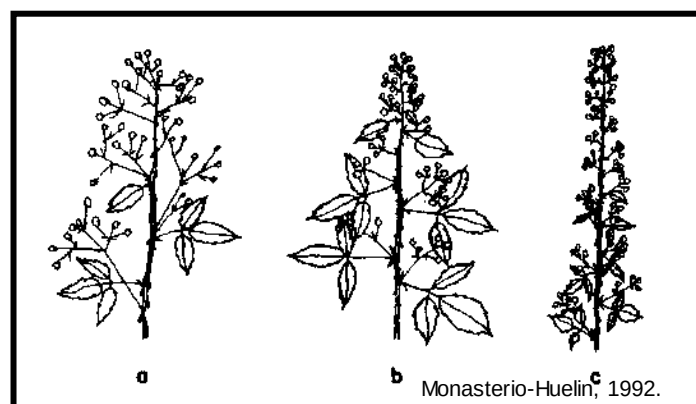


Figura 6. Formas de la inflorescencia en *Rubus*: a) piramidal truncada, b) piramidal, c) cilíndrica.

2.1.7 Flor

La flor de las zarzamoras puede ser heteroclamídea y hermafrodita; el cáliz está formado por cinco piezas imbricadas, dialisépalas y persistentes; los sépalos son enteros, de forma lanceolada y acabados en una punta que a veces se prolonga en un acumen más o menos largo; la cara externa está cubierta de pelos cuya forma y cantidad es variable: los sépalos son de color verde y, sobre todo en la primera, con pocos pelos, lo que expresa que el borde sea blanco, los sépalos están recubiertos de un tomento abundante, lo que les da una tonalidad gris o blanca; asimismo, casi todas las zarzamoras tienen glándulas sentadas en la cara externa de los sépalos y pueden presentar o no aculéolos y glándulas pedunculadas. La posición erecta, patente o reflexa es una característica para cada especie, al variar, dentro de una misma especie, en la floración y la fructificación la mayoría de las flores tienen el cáliz reflexo o patente y sólo en pocas especies, como es el caso de *Rubus caesius*, es erecto (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

El color de los pétalos varía entre blanco, rosa-violeta y rojo y suele ser constante para cada especie, salvo algunas excepciones, como es el caso de *Rubus ulmifolius*, lo más abundante son las formas de pétalos rosas, aunque también se encuentran pies con flores blancas (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). *Rubus canescens* se caracteriza por tener los pétalos, en vivo, de color blanco-amarillo y virar a amarillo casi inmediatamente después de cortar la inflorescencia. Aunque lo normal son las corolas pentámeras, el número de piezas puede ser mayor de cinco o incluso presentar corola doble; la forma de los pétalos (transovada, oval o suborbicular) y el tamaño de éstos son valores más o menos constantes para cada especie (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

La coloración de los estambres en la parte basal del filamento suele coincidir con la de los pétalos y, conforme se asciende hacia las anteras, el color es verde o blanco; las anteras son glabras en la mayoría de las especies, pero también las hay

pelosas; la pilosidad de las anteras, dentro de una misma especie, es una característica más o menos constante (Monasterio-Huelin, 1992).

El gineceo es pluricarpelar y apocárpico, de cada ovario surge un estilo subterminal rematado en un estigma capitado; los estilos son casi siempre de color blanco o verde, pero en algunos casos, toman una coloración rosácea, lo que suele ocurrir en flores con los pétalos rosas; el ovario puede ser glabro o piloso y en este caso, los pelos se sitúan preferentemente en la parte apical; la forma del tálogo puede ser plana o cónica y su pilosidad varía desde especies glabras a muy pilosas (Monasterio-Huelin, 1992).

2.1.8 Fruto

El fruto es una polidrupa con las drupeolas algo concrecentes en la base, pero sin llegar a ser totalmente sincárpicas; el número y tamaño de las drupelas es variable, aunque en algunas secciones de este género, todas las drupelas se desarrollan, además de que su sabor suele ser dulce, mientras que en otras, muchos de los carpelos son abortados y las drupelas que se forman son de mayor tamaño y de sabor casi siempre ácido; el color de las drupelas puede ser negro brillante, negro mate, negro azulado, azul, rojo o amarillo (Monasterio-Huelin, 1992; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

2.1.9 Semilla

Los frutos son polidrupas y cada drupa contienen una semilla, las cuales se pueden desprender del receptáculo con o sin parte de él; las drupas exhiben texturas diversas, con forma ovoide globosa y semillas ovoides globosas, con testa delgada, membranosa y cotiledones plano-convexos (Harling y Anderson, 1996; Shu, *et al.*, 2003).

2.1.10 Importancia de la zarzamora

La industrialización de las frutillas genera, a nivel nacional, entre 80,000 y 100,000 empleos directos e indirectos; la gran mayoría se ubican en Michoacán y Jalisco, con su consecuente derrama económica. México cuenta con las condiciones climáticas productivas y sanitarias para la producción, industrialización y comercialización de las frutillas (zarzamora, fresa, frambuesa y arándano), ante lo que el gobierno federal desarrolla esquemas de trabajo dirigidos a fortalecer este cultivo (SAGARPA, 2015).

2.1.11 Producción de la zarzamora

El principal mercado en América es los Estados Unidos (USA), quien compra éste producto a lo largo de todo el año, y donde México es uno de sus principales exportadores debido a su estacionalidad, la cual es una estrategia que representa una venta comercial natural (Coronado *et al.*, 2014).

En cuanto al rendimiento de éste fruto, sin duda varían de acuerdo a la región o micro clima donde se cultiva. En México los principales productores son, el estado de Michoacán, Hidalgo, México, Jalisco, los dos primeros son los que han registrado los mayores rendimientos por hectárea en el país, siendo de estos hasta 12 toneladas (Coronado *et al.*, 2014).

2.1.12 Usos de la zarzamora

Las frutas rojas y bayas, como las fresas, arándanos y zarzamoras, son consumidas a nivel mundial en fresco y en forma de productos procesados, tales como zumos, confituras, frutas desecadas, y helados, entre otros (Amakura *et al.*, 2000). Estas frutas constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en nuestra dieta, especialmente ácidos benzoicos y cinámicos, antocianinas, flavonoles, catequinas y taninos (Macheix *et al.*, 1990).

2.1.13 Propiedades nutricionales

La zarzamora tiene una amplia gama de propiedades de salud y nutrición entre las que destacan sus altos contenidos vitamínicos que comprenden el complejo B, A, C y E principalmente, así como un aporte importante de minerales como potasio, fósforo, hierro, sodio, magnesio, manganeso, selenio, zinc, cobre, calcio, y compuestos esenciales como lo son el ácido fólico y la niacina (Coronado *et al.*, 2014). Esta frutilla es también altamente refrescante, además de que combate la diarrea y la fiebre; tiene también propiedades diuréticas; combate la gripa, resfriados, tos y constipaciones alérgicas; también ayudan a reducir inflamaciones internas, fortalece la sangre y fomenta la coagulación; también combate los espasmos y las molestias menstruales, además de ser un excelente antioxidante (Coronado *et al.*, 2014)

Las zarzamoras silvestres han demostrado tener un mayor contenido de polifenoles y una mayor capacidad antioxidante que las variedades comerciales (Reyes, 2010)

2.2 Descripción de las especies en Michoacán

2.2.1 *Rubus adenotrichus*

Arbusto arqueado, trepador o reclinado sobre otras plantas, hasta de 6(9) m de alto, siempre verde; tallos rojizos, hasta de 3 cm de grosor, densamente cubiertos (al menos en la juventud) con pelos o cerdas glandulares rojizas hasta de 3(5) mm de largo, además de pelos cortos carentes de glándulas y llevando también numerosos aguijones amarillentos, encorvados, glabros, hasta de 5 mm de largo; estípulas linear-subuladas a filiformes, de 4 a 10 mm de largo, peciolo hasta de 7 cm de largo con indumento similar al de los tallos, láminas foliares casi siempre en su mayoría digitadamente 5-folioladas, las superiores trifolioladas o a veces

simples, peciólulo del foliolo terminal hasta de 3 cm de largo, los de los foliolos laterales paulatinamente más cortos, foliolos ovados a elípticos u obovados, de (3)5 a 8(12) cm de largo y (1.5)2 a 5(6) cm de ancho, acuminados en el ápice, truncados a subcordados en la base, por lo general fina y no pocas veces doblemente aserrados desde el ápice hasta cerca de la base, de textura membranácea a cartácea, más pálidos en el envés, viloso-pubérulos en ambas caras, con la pubescencia mayormente concentrada sobre las nervaduras en el envés, donde a menudo se observan también varios aguijones sobre la costa; inflorescencia en forma de amplia panícula terminal de contorno piramidal, más o menos foliosa en la base, hasta de 35 cm de largo, pubescente a semejanza de los tallos, pero por lo general sin aguijones, brácteas linear-lanceoladas, a menudo partidas, hasta de 12 mm de largo; segmentos del cáliz ovados a oblongos, de 4 a 6 mm de largo, cuspidados a largamente caudados en el ápice, blanco-tomentosos en ambas caras y glandular pubescentes por fuera; pétalos blancos o rosados, obovados, de 5 a 10 mm de largo, con frecuencia escotados en el ápice; fruto colectivo ovoide, de 1 a 2 cm de largo, desprendiéndose junto con el receptáculo, drupillas numerosas, casi negras en la madurez, glabras figura 7. Elemento frecuente y a menudo abundante en el norte de Michoacán, propio principalmente de la vegetación secundaria derivada de bosques húmedos de coníferas y de encino, así como del bosque mesófilo de montaña. Altura 1800-2800 m. Se ha colectado en flor de octubre a junio y en fruto maduro de marzo a noviembre (Rzedowski y calderón de Rsendowki, 2005).

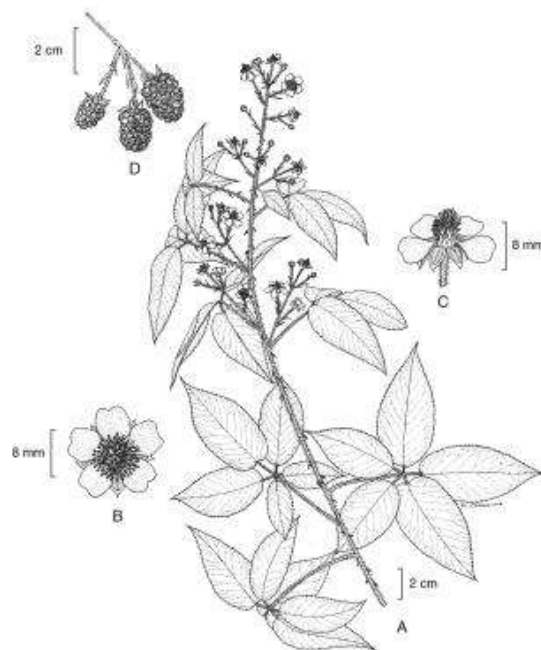


Figura 7. *R. adenotrichus*. A. Rama con hojas y inflorescencia, B. flor vista de frente. C. flor desprovista de un pétalo y de los estambres. D. conjunto de frutos agregados

2.2.2 *Rubus humistratus*

Planta subarborescente; tallos principales hasta de 2 m de largo, por lo general todos rastreros, aunque a menudo las ramillas fértiles erectas y hasta de 15(40) cm de largo, los maduros hasta de 6 mm de diámetro, con corteza rojiza, glabra y algo exfoliante, los más jóvenes verdes, vilosos a pilosos y con aguijones amarillentos, retróscos, más bien débiles, hasta de 2.5 mm de largo; estípulas linear-subuladas, de 3 a 9 mm de largo, peciolo hasta de 6 cm de largo, con indumento similar al de los tallos, láminas comúnmente trifolioladas, rara vez digitadamente 5-folioladas, las cercanas a las flores a menudo simples y en ocasiones trilobadas, peciólulo del foliolo terminal hasta de 10(13) mm de largo, los de los folíolos laterales de 0 a 2 mm de largo, láminas ovadas a elípticas u obovadas, de (0.8)1.5 a 7(11) cm de largo y de (0.6)1 a 3(4.5) cm de ancho, agudas a cortamente acuminadas (rara vez redondeadas) en el ápice, cuneadas a

subcordadas en la base, con margen por lo común tosca pero otras veces doble y/o finamente serrado, de textura herbácea a cartácea, verdes oscuras y glabras o esparcidamente pilosas en el haz, más pálidas y finamente pubérulas sobre las principales nervaduras del envés, donde a menudo se encuentran provistas de uno o unos pocos aguijones en la costa; flores solitarias y terminales, o bien, agrupadas por pocas en corimbos, sobre pedúnculos aculeados hasta de 6 cm de largo, en ocasiones provistos también de glándulas rojizas sésiles o cortamente estipitadas; segmentos del cáliz ovados, de 4 a 8(11) mm de largo, cuspidados ocaudados en el ápice, pubérulos a tomentosos en ambas superficies, patentes en la antesis, envolventes en fruto; pétalos blancos, anchamente elípticos o subespatulados a obovados o suborbiculares, de 7 a 10(20) mm de largo, a menudo unguiculados en la base; fruto colectivo subcónico a hemisférico o subesférico, de 4 a 7(10) mm de largo y 7 a 10 mm de diámetro, desprendiéndose junto con el receptáculo, drupillas hasta alrededor de 20 pero por lo general mucho menos, rojizas a casi negras en la madurez, comúnmente glabras. Elemento propio de bosques más bien húmedos de encino y de pino, así como del bosque mesófilo de montaña, con más frecuencia en la vegetación secundaria correspondiente, tanto de Guanajuato, como de Querétaro y del norte de Michoacán. Alt. 1150-2700 m. Se ha colectado en flor a lo largo del año, en fruto entre julio y noviembre (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

2.2.3 *Rubus cymosus*

Arbusto reclinado, aunque en ocasiones con brotes tiernos erectos, y no pocas veces con algunas ramas rastreras, a veces formando extensas colonias clonales, hasta de 2(3) m de alto; tallos principales rollizos, hasta de 1.5 cm de diámetro, por lo general rojizos pero a veces glaucos, comúnmente glabros y provistos de aguijones retrorsos de 1 a 3 mm de largo, tallos jóvenes densamente vilosos o pubérulos; estípulas linear-subuladas, de 3 a 7 mm de largo, viloso-pubérulas por fuera, peciolos hasta de 10 cm de largo, con indumento similar al de los tallos, peciólulo del foliolo terminal hasta de 5 cm de largo, los de los foliolos laterales por

lo general de (0)1 a 2 mm de largo, pero en las hojas grandes hasta de 2 cm de largo, láminas foliares casi siempre trifolioladas, algunas simples, muy ocasionalmente alguna 5-foliolada, foliolos ovados a obovados o suborbiculares, rara vez lanceolados, de (2)3 a 7(11) cm de largo, de (1)2 a 4(7) cm de ancho, agudos a acuminados en el ápice, cuneados a subcordados en la base, por lo común finamente serrados, pero en ocasiones condientes toscos adicionales en el margen, verdes oscuros, pilosos o pubérulos y glabrescentes en el haz, más pálidos y con la pubescencia mayormente concentrada sobre las nervaduras o a veces casi ausente en el envés, donde en la costa suelen observarse algunos pequeños aguijones; inflorescencias en forma de cimas, con frecuencia corimbiformes, por lo general paucifloras, terminales o a veces axilares, sus ejes viloso-tomentosos, ocasionalmente también con algunos pelos glandulosos rojizos, con o a veces sin aguijones; segmentos del cáliz ovados, de 4 a 7 mm de largo, agudos y a menudo apiculados en el ápice, blanco-tomentosos en ambas superficies; pétalos blancos, angostamente obovados, elípticos o subespatulados, de 7 a 8(10) mm de largo; fruto colectivo globoso a subgloboso, de 1 a 1.2 cm de diámetro, drupillas individuales 15 a 50, moradas oscuras en la madurez, pubescentes al menos en sus ápices. Elemento moderadamente frecuente y a menudo abundante en la vegetación secundaria derivada de bosques de encino, de coníferas y del bosque mesófilo de montaña, a menudo a orilla de caminos y en cercas en el norte de Michoacán, menos común en el noreste de Querétaro. Alt. 1800-2800 m. Florece de marzo a diciembre; se ha encontrado en fruto entre mayo y noviembre (Rzedowsky y Calderón de Rzedowsky, 2005).

2.2.4 *R. coriifolius*

Se ha colectado en el norte de Michoacán en localidades pertenecientes a la cuenca del Balsas y algunas no muy lejanas del límite del área de estudio, por lo que no es imposible que se encuentre también en su interior. Se trata de un

arbusto arqueado trepador o reclinado sobre otras plantas; con hojas de textura coriácea y sin tomento blanquecino en el envés, los tallos son densamente pubescentes pero carecen de pelos glandulares, mientras que la inflorescencia es una panícula terminal amplia sin aguijones en sus ejes con un gran número de flores de color blanco. (Rzedowsky y Calderón de Rzedowsky, 2005).

2.2.5 *Rubus sapidus*

Arbusto erecto, arqueado o trepador hasta de 2.5(5) m de alto, a menudo formando densos conjuntos clonales de varios metros de diámetro; tallos principales semiangulosos, por lo común rojizos, pilosos, vilosos o glabros con la edad, emitiendo comúnmente numerosas ramas floríferas laterales cortas, todos densamente provistos de aguijones retrorsos fuertes hasta de 5 mm de largo; estípulas lineares, de 6 a 10 mm de largo, peciolas hasta de 8 cm de largo, con indumento similar al de los tallos, peciólulo del foliolo terminal hasta de 3(4) cm de largo, los de los foliolos laterales por lo general de 0 a 2(3) mm, pero en las hojas de las ramas estériles a veces hasta de 2 cm de largo, láminas foliares en su mayoría trifolioladas, aunque en las ramas estériles pueden llevar 5 foliolos y cerca de las inflorescencias a menudo se observan una o varias láminas simples, foliolos ovados a obovados o subrómicos, de (1.5) 2 a 7(8) cm de largo, de (0.8)1 a 5(6) cm de ancho, agudos o acuminados en el ápice, cuneados a subcordados en la base, toscamente serrados en el margen, con frecuencia de textura coriácea en la madurez, verdes oscuros y esparcidamente pilosos pero pronto glabrescentes en el haz, más pálidos, pilosos y suaves al tacto en el envés, en cuya costa se observan por lo general varios aguijones; inflorescencias terminales, comúnmente mutifloras, por lo general en forma de corimbos foliosos, pero no pocas veces asumiendo el aspecto de panículas hasta de 25 cm de largo, sus ejes viloso-pilosos, densamente aculeados y en ocasiones también provistos de glándulas estipitadas, brácteas similares a las estípulas; segmentos del cáliz ovados a lanceolados o triangulares, de 6 a 10 mm de largo, apiculados a

caudados en el ápice, blanco-tomentosos en ambas superficies; pétalos blancos, obovados a suborbiculares, de 9 a 13 mm de largo; fruto colectivo ovoide, globoso o subgloboso, de 1.5 a 1.8 cm de largo de 1 a 1.5 cm de diámetro, desprendiéndose junto con el receptáculo, drupillas individuales casi negras en la madurez, glabras o algo pubescentes en el ápice. Elemento relativamente poco frecuente en bosques de pino, de encino y mesófilos de montaña, sobre todo en la vegetación secundaria correspondiente, en el noreste de Querétaro, así como en el norte de Michoacán, donde también se ha registrado creciendo en bosques de galería. Alt. 1200-2050 m. Se ha colectado en flor entre febrero y agosto (Rzediowsky y Calderón de Rzedowsky, 2005).

2.3 Identificación por caracterización morfológica

Consiste en establecer todos los caracteres posibles de un vegetal, con el objetivo principal de identificar una especie o un cultivar (Gonzalez-Andres, 2001). Para identificar un vegetal se utilizan las características mas evidentes (principalmente morfológicos) y además únicas del vegetal que se esté tratando de identificar, lo que evitará equivocaciones (Gonzalez-Andres, 2001). La caracterización debe abordarse sobre diferentes partes de la planta, en diferentes estados fisiológicos y con diversos tipos de caracteres, debiendo también analizar todos ellos en conjunto (Gonzalez-Andres, 2001). La caracterización puede ser de tipo cualitativo o cuantitativo, e incluyen algunos de los caracteres botánicos-taxonómicos, más otros que no necesariamente identifican la especie, pero que son importantes desde el punto de vista de necesidades agronómicas, de mejoramiento genético, de mercadeo y consumo. Como ejemplo de estos caracteres se pueden mencionar las siguientes: forma de las hojas; pigmentación en raíz, tallos, hojas, flores; color, forma, y brillo de las semillas; tamaño, forma y color de frutos; arquitectura de la planta, expresada ésta en habito de crecimiento y tipo de ramificación. Algunos curadores de bancos de germoplasma incluyen descriptores relacionados con componentes de rendimiento, con el objetivo de

proveer a los Fitómejoradores indicación del potencial de este carácter en el germoplasma conservado. En su gran mayoría estos descriptores tienen aceptable heredabilidad, pero son afectados por cambios ambientales (Hidalgo, 2003). Los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que se encuentran menos influenciados por el ambiente, como son la flor y el fruto; en importancia decreciente están las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares (Enriquez, 1991).

2.4 Métodos estadísticos multivariados en la caracterización

El origen del análisis multivariado se remonta a comienzos del siglo XX, con Pearson y Sperman, época en la cual se empezaron a introducir los conceptos de la estadística moderna; pero las bases definitivas de este tipo de análisis se establecieron en la década 30-40 con Hotelling, Wilks, Fisher, Mahalanobis y Bertlett (Bramardi, 2002). En términos generales, el análisis multivariado se refiere a todos aquellos métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples (más de dos variables) de cada individuo; y en sentido estricto, es una extensión de los análisis univariados (análisis de distribución) y bivariados (clasificación cruzadas, correlaciones, análisis de varianza y regresión simples) que se consideran como tal, si todas las variables son aleatorias y están interrelacionadas (Hair *et al.*, 1992).

En la caracterización de recursos fitogenéticos, el análisis multivariado se puede definir como un conjunto de métodos de análisis de datos que tratan un gran número de mediciones sobre cada accesión del germoplasma; su virtud principal consiste en permitir la descripción de las accesiones, sin dejar de considerar la relación existente entre ellas (Hair *et al.*, 1992).

El objetivo principal de los análisis multivariados es procesar y resumir grandes cantidades de datos, por medio de relativamente pocos parámetros, y entregar resultados útiles que puedan ser interpretados; pero otras características

fundamentales de estos métodos es la simplicidad de sus respuestas, lo que significa que los modelos matemáticos usados para interpretar los datos pueden ser complejos, aunque las respuestas entregadas deben ser claras (Hair *et al.*, 1992).

Análisis de componentes principales (ACP). Este método se basa en la transformación de un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. Los componentes deben ser interpretados independientemente unos de otros, ya que contienen una parte de la varianza que no está expresada en otros componentes principal (López-Hidalgo, 1994).

El ACP es una herramienta útil para analizar los datos que se generen de la caracterización y evaluación preliminar de germoplasma, y permitir conocer la relación existente entre las variables cuantitativas consideradas y la semejanza entre las accesiones; en el primer caso, con el fin de saber cuáles variables están o no asociadas, cuáles caracterizan en el mismo sentido o en sentido contrario; y en segundo, para saber cómo se distribuyen las accesiones, cuáles se parecen y cuáles no. También permite seleccionar las variables cuantitativas más discriminatorias para limitar el número de mediciones en caracterizaciones posteriores (López-Hidalgo, 1994).

2.5 Polifenoles

Los polifenoles, o compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios de plantas involucradas en diversos mecanismos de defensa, como la protección contra la radiación ultravioleta o agresiones por parte de agentes patógenos entre otros; muchos son solubles en agua o en solventes orgánicos y se conocen cerca de 8000 moléculas diferentes (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

2.5.1 Estructura

Las moléculas fenólicas se caracterizan por poseer uno o más anillos bencénicos y por lo menos un sustituyente hidroxilo. Tienen gran capacidad de reacción, existen combinadas con ácido orgánico o un azúcar (ácidos fenólicos, flavonoles y antocianinas), o con ellas mismas formando un polímero (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

2.5.2 Biosíntesis

Los polifenoles de las plantas son biosintetizados por dos rutas metabólicas: la del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico (Figura 8). La vía del ácido shiquímico es la ruta por la que se producen la mayoría de los polifenoles de las plantas superiores, utilizando como sustrato la eritrosa-4-fosfato, de la vía de las pentosas fosfato, y el ácido fosfoenolpirúvico proveniente de la glucólisis (Murcia *et al.*, 2002; Tomás-Barberán, 2003). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, aminoácido esencial sintetizado en el metabolismo primario de las plantas, entra al metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio, convirtiendo a la fenil-alanina en ácido cinámico (Murcia *et al.*, 2002; Tomás-Barberán, 2003).

El ácido malónico es la vía por la cual hongos y bacterias forman polifenoles; su sustrato es acetil-CoA (Taiz y Zeiger, 2006).

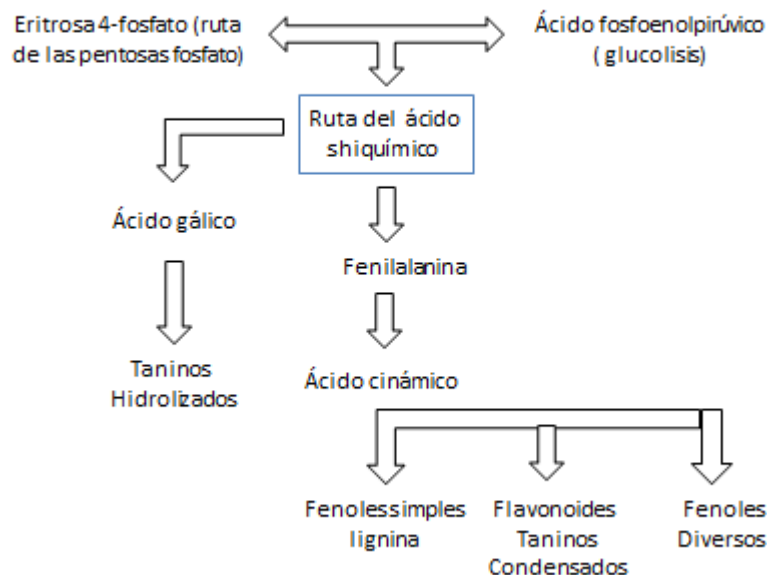


Figura 8. Compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina, un producto del ácido shiquímico

2.5.3 Clasificación de los polifenoles

Debido a las numerosas clasificaciones que existen de los polifenoles, se hará referencia sólo a la clasificación según la ruta biosintética (Cuadro 2) Boluda *et al.*, 2005; Carretero, 2000; Isaza, 2007; Martínez, 2005; Murcia *et al.*, 2003; Taiz y Zeiger, 2006).

Cuadro 2. Clasificación de los polifenoles según su ruta biosintética

Ruta biosintética	Compuesto fenólico derivado	Ejemplos
Ruta del ácido shiquímico	Fenoles sencillos	Presente en plantas de las familias Ericácea y Rosaceae (hidroquinonas)
	Ácidos fenólicos	Ácido cinámico (ácido

		cafeíco, ferúlico, p-cumárico, clorogénico)
	Cumarinas	Sencillas (esculetol, escopoletol) -complejas (visnadina, piranocumarina)
	Lignanós	Presentes en briofitas, helechos y semillas de plantas superiores (entorolactona, enterodiol)
Ruta de los poliacetatos	Quinonas	Hidrolizables (taninos gálicos y elágicos); condensados o proantocianidinas
Rutas del ácido shiquímico y ácido malónico	Flavonoides	Distribuidas en microorganismos, insectos y plantas, principalmente en las familias Rubiaceae, Rhamnaceae y Polygonaceae - Benzoquinonas - Naftoquinonas - Antraquinonas
		- Antocianinas - Flavanoles - Flavanonas - Flavonoles - Flavonas

		- Isoflavonas
--	--	---------------

2.5.4 Función de los polifenoles en plantas

Los polifenoles tienen diversas funciones en las plantas y diversos modos de acción (Figura 9). En aquellos que generalmente son inducidos por activación oxidativa, las condiciones ambientales controlan la oxidación y así generan la variación en la actividad ecológica de los polifenoles; en las plantas, los polifenoles tienen funciones como el reconocimiento por insectos polinizadores; la protección contra la agresión de herbívoros, insectos, hongos, bacterias y virus y reducir la competencia entre plantas función alelopática (Vivanco *et al.*, 2005).

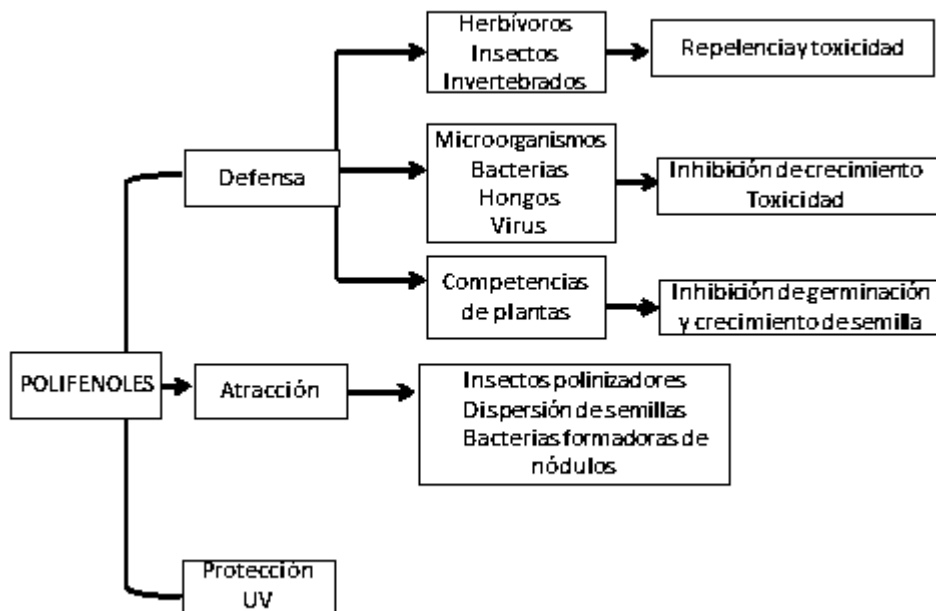


Figura 9. Principales funciones de los polifenoles en las plantas

Otra función importante de los polifenoles es la de servir como protección para la planta contra la radiación UV. Las plantas requieren la luz del sol para

fotosintetizar; sin embargo, los rayos ultravioleta de la luz solar son componentes potencialmente peligrosos, ya que éstos pueden dañar directamente el ADN y desencadenar severos procesos fisiológicos (Koes *et al.*, 1994). La mayoría de los polifenoles son pigmentos que funcionan como señales visuales para los insectos polinizadores, por lo general, plantas que requieren de insectos polinizadores para efectuar la polinización poseen flores con pétalos de colores brillantes; muchos de estos pigmentos pertenecen a los flavonoides, principalmente las antocianinas, que se biosintetizan en un lugar y en un periodo específico en la planta y se encuentran en cantidades importantes en flores y fruto (Koes *et al.*, 1994).

2.5.5 Funciones de los polifenoles en humanos

Además de las importantes funciones que los polifenoles ejercen en las plantas, a algunos como fenoles sencillos, ácidos fenólicos y flavonoides se les han atribuido actividad farmacológica y médicas relacionadas con la prevención y el tratamiento de ciertas patologías, ya que poseen actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicas, antivirales y en general todas las enfermedades en donde el estrés oxidativo esté implicado (Xiuzhen *et al.*, 2007).

2.6 Cuantificación de polifenoles

La importancia de los compuestos fenólicos en la dieta humana ha despertado la atención científica; cada vez es más frecuente encontrar referencias acerca del perfil y contenido de compuestos fenólicos en los alimentos. Este interés ha generado el desarrollo de diversos métodos con el fin de cuantificar dichos compuestos. Entre lo más destacables se encuentra métodos cromatográficos, como son la cromatografía en la capa fina, cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (Prior *et al.*, 2005).

También están los ensayos espectrofométricos, como el ensayo de Folin-Ciocalteu, un método frecuentemente utilizado para determinar la cantidad de compuestos fenólicos, este método se fundamenta en la generación de un cromógeno azul derivado de la reducción de los ácidos (reactivo de Folin-Ciocalteu) al oxidar los compuestos fenólicos; éste se ha reportado en diversos estudios relacionados con la cuantificación de compuestos fenólicos (Prior *et al.*, 2005).

2.7 Niveles de ploidía

Para los fitomejoradores es importante conocer el número cromosomas de las plantas, ya que ello permite hacer efectiva las hibridaciones, estudios evolutivos, filogenéticos, genéticos y taxonómicos (Nathewey *et al.*, 2009). Las especies del género *Rubus* presentan la no reducción de gametos, duplicación de genoma y apomixis (Meng y Finn, 2002); la poliploidía en *Rubus* va desde diploides ($2n = 2x = 14$) hasta pentadecaploides ($2n = 14x = 98$); posiblemente existen hasta octadecaploides ($2n = 18x = 126$), incluyendo número de cromosomas impares y aneuploídes (Delgado-Lina *et al.*, 2010; Meng y Finn, 1999; Thompson, 1995). En especies diploides el tamaño de los cromosomas van de 1 a 3 μm de longitud, con un contenido de ADN de 0.56 a 0.59 pg (Lim *et al.*, 1998; Meng y Finn, 2002); sin embargo, los genotipos con el mismo número de cromosomas pueden diferir en el contenido de ADN y producir progenies poliploides (Meng y Finn, 2002).

La poliploidia plantea un desafío en la segregación de los cromosomas, debido que cada cromosoma presenta más de un homólogo (Mercier *et al.*, 2015). La duplicación del genoma entero, o poliploidía, juega un papel importante en la evolución de todas las angiospermas; permite que los híbridos interespecíficos fértiles generen múltiples genes para alelos en cada locus; mediante la liberación de genes duplicados de las mutaciones y a través de la especiación con flujo

limitado de genes (Proost *et al.*, 2011; Soltis y Burleigh, 2009). Por otro lado, las cruza heteroploides son utilizadas para introducir genes deseables, de especies silvestres o materiales élite, entre especies o cultivos y capaces de generar progenies con variación en niveles de ploidía (Meng y Finn, 2002). De acuerdo con Rieseberg y Willis (2007), la poliploidía permite que las especies presenten una rápida evolución y adaptación.

Existen diversas metodologías para clasificar y contar el número de cromosomas, entre ellas, el método convencional que consiste en el conteo de cromosomas en células somáticas bajo microscopio, usando tejidos meristemáticos o tipos de brotes y a través de células madres del polen (Nathewet *et al.*, 2009; Thompson, 1997). Otros métodos para determinar el nivel de ploidía son: la medición del tamaño del polen (Otto y Whitton, 2000) y el número de cloroplastos en las células de la epidermis (Masterson, 1994); sin embargo, éstas son técnicas no precisas.

Las técnicas modernas que se están utilizando son: la hibridación genómica *in situ* (GISH), la cual usa el ADN genómico total (Heslop-Harrison y Schawarzacher, 2011), y la técnica del citómetro de flujo (Bennett y Leitch, 2011), que consiste en determinar el contenido de ADN de forma rápida y eficiente en las plantas y animales (Galbraith *et al.*, 1983).

La citometría de flujo ofrece opciones para determinar el tamaño, composición y niveles de poliploidía de genomas en especies con interés taxonómico, y también para el mejoramiento genético en plantas (Bennet *et al.*, 2000). Además, permite esclarecer la taxonomía y biodiversidad, e incluso plantear estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* (Palomino y Allen, 2005).

2.8 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de las propiedades ópticas (dispersión de la luz y fluorescencia) de partículas que fluyen en una

suspensión líquida (Figura 10); esta medición en flujo es efectuada a alta velocidad (e.g., análisis de 100-1000 partículas por segundo) y garantiza un análisis objetivo de las partículas que constituyen la población de interés (Dolezel, 1997).

Los investigadores del área de biología vegetal, estimulados por las potencialidades de la citometría de flujo, desarrollan metodologías para su aplicación al estudio de células vegetales; desde entonces, el espectro de aplicaciones de la citometría de flujo en plantas ha aumentado de manera exponencial (Dolezel, 1997).

Esta técnica permite una discriminación eficaz y precisa de la cantidad de núcleos (previamente aislados y marcados con un fluorocromo) existentes en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M); una vez que las medidas de fluorescencia son expresadas en una escala arbitraria, la obtención de estimaciones del contenido en ADN nuclear de un determinado tejido o individuo requiere la comparación, con la fluorescencia de núcleos aislados, de un estándar de referencia con tamaño de genoma conocido (Heller, 1973). Este tipo de análisis está teniendo un impacto elevado en diversas áreas de la biología vegetal, especialmente en disciplinas como la biosistemática, la biotecnología, mejora de plantas y la ecología.

En general, los protocolos desarrollados para el aislamiento de núcleos de tejidos vegetales (Figura 10) son relativamente simples y rápidos (una muestra es preparada en aproximadamente 5 minutos), permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras por día; sin embargo, el análisis de especies recalcitrantes, como por ejemplo las plantas leñosas, puede implicar un gran número de problemas, esencialmente de aquellos relacionados con la presencia de metabolitos secundarios en el citosol que son liberados durante la preparación de las muestras (Galbraith *et al.* 1983).

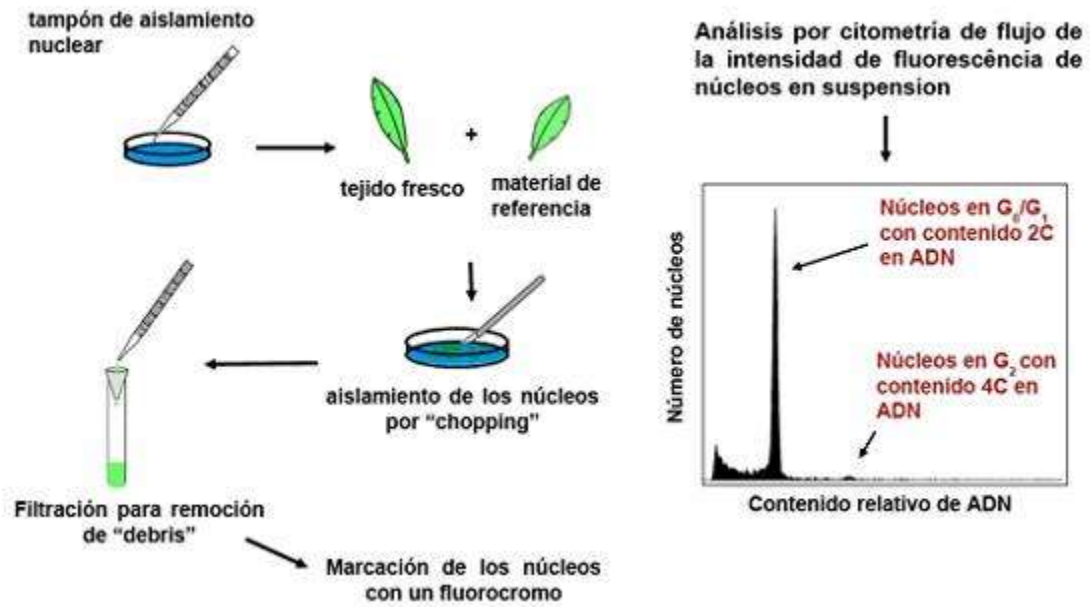


Figura 10. Diagrama de la metodología utilizada para la preparación de muestras para la determinación del contenido en ADN por citometría flujo

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema general de trabajo

Figura 11. Se muestran, de manera general, las principales actividades realizadas en el presente trabajo.

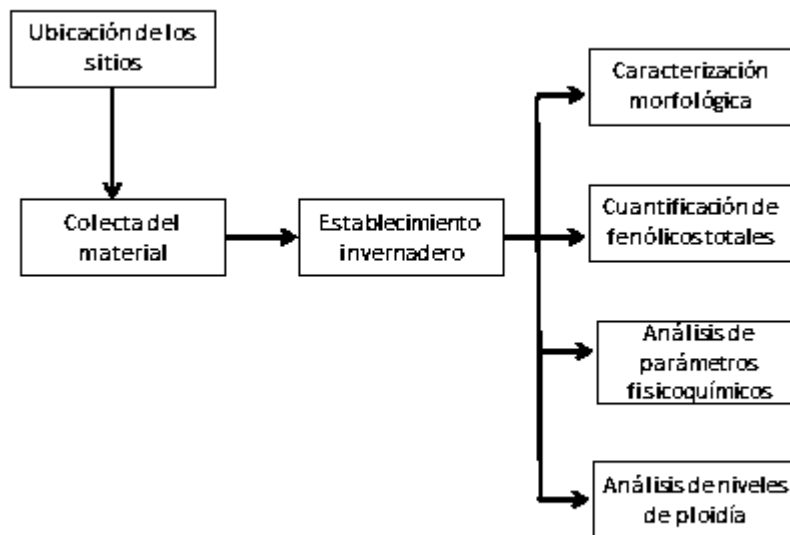


Figura 11. Esquema general de trabajo de investigación

Ubicación del área experimental

La presente investigación se desarrolló en el invernadero asignado al programa de Mejoramiento Genético de Frutillas, en la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

Obtención del material vegetal

La colecta de materiales se realizó *in situ* en diferentes zonas aledañas a Uruapan Michoacán; ello se hizo con base a la información botánica previamente existente (Cruz, 2007; Mora Macías, 2009; Rzedowsky y Calderón de Rzedowski, 2005).

Los frutos fueron transportados de los sitios de colecta al laboratorio, en una hielera y en bolsas de plástico. Al momento de su llegada, los materiales se congelaran con nitrógeno líquido y luego se almacenaran a -20 °C.

Ubicación:

Para la ubicación de las especies, se consultó el programa GBIF (acceso directo a los datos de biodiversidad), del cual se obtuvo una base de datos con las coordenadas de los sitios donde se ubica cada una de las especies (Cuadro 3; Figura 12)

Cuadro 3. Localización de las especies de *Rubus* en las zonas aledañas a Uruapan, Michoacán.

Especie	<i>R. Adenotrichus</i>	<i>R. coriifolius</i>	<i>R. humistratus</i>	<i>R. sapidus</i>	<i>R. cymosus</i>
Localidad	-Cerro de la charanda -Crucero los reyes -San Lorenzo	-Gasolinera -San Juan Nuevo -Cerro de la charanda	Afuera del tecnológico	Cocinas	Milpillas
Altitud (m.s.n.m)	1770 msnm 1896 msnm	1774 msnm 1878 msnm 1776 msnm	1782 msnm	2253 msnm	2013 msnm
Latitud	19°26'4.60"N 19°31'50.25"N 19°30'38.27"N	19°26'49.94"N 19°24'39.14"N 19°26'6.91"N	19°28'19.18"N	19°30'34.82"N	19°24'47.09"N
Longitud	102° 3'41.61"O 102° 4'35.82"O 102° 7'6.88"O	102°4'35.07"O 102°8'46.27"O 102°3'30.40"O	102°4'24.00"O	102°9'23.77"O	102° 9'3.29"O

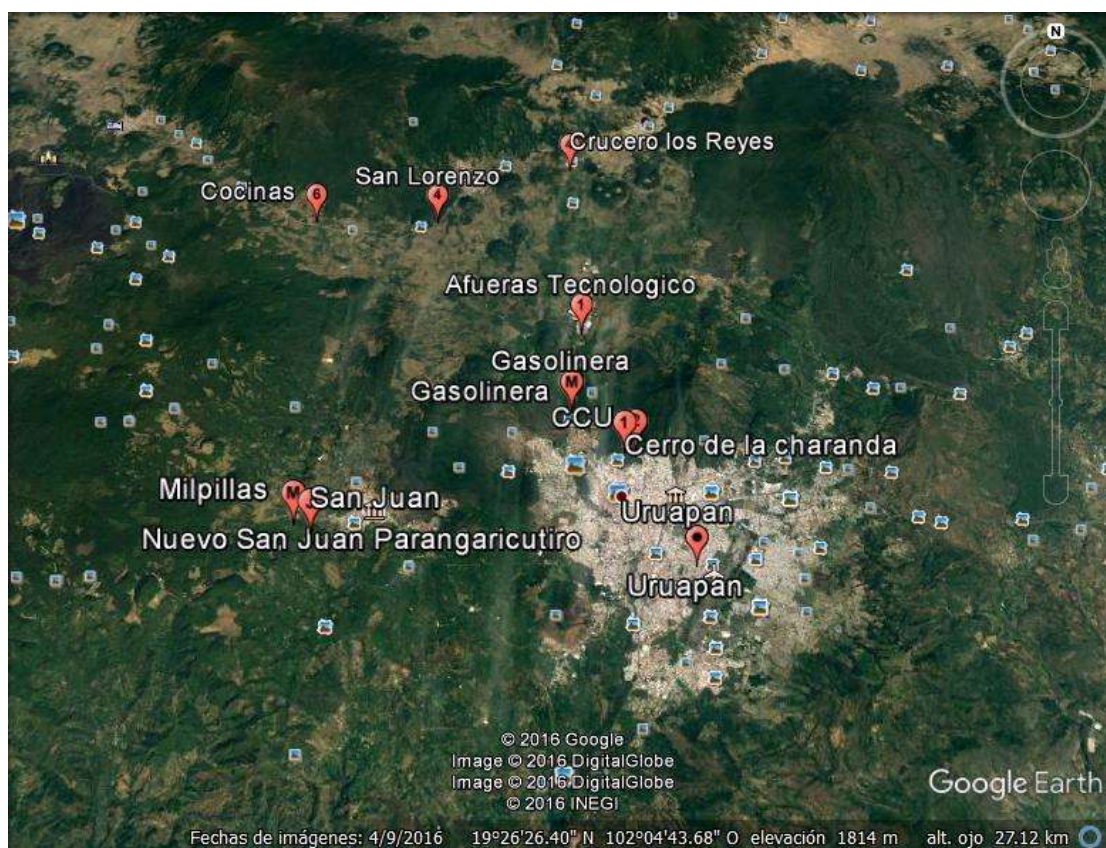


Figura 12. Mapa que muestra los sitios de colecta de las zarzamoras silvestres

Diseño del experimento

El experimento se terminó de establecer en Marzo del 2015 bajo condiciones de invernadero. Para ello, se emplearon diez genotipos (9 materiales silvestres y una variedad comercial) y de cada uno de éstos se tomó la mayor cantidad posible de estacas de tallo para su establecimiento y propagación (Figura 13). Las estacas fueron primeramente sumergidas en Captan y Benomil para su desinfección, luego fueron colocadas en macetas de plástico de 2.5 L y un sustrato compuesto por partes iguales de suelo y turba, enriquecido con un fertilizante completo de liberación controlada. El experimento se codujo bajo un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones de cada tratamiento.



Figura 13. Material vegetal de *Rubus* spp.

Toma de datos

Para la caracterización morfológica se consideraron 41 de 44 descriptores para zarzamora establecidos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) se observan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Lista de descriptores de la UPOV, abreviación y forma de evaluación

Descriptores	Abreviación	Evaluación
Porte de la planta	PP0	Erecto (1), erecto a semierecto (2), semierecto (3), semierecto a rastrero (4), rastrero (5)
Planta: número de ramas nuevas	PNR	Muy bajo (1), bajo (3), medio (5), alto (7)
Rama latente: Longitud	RLL	Corta (3), media (5), larga (7), muy larga (9).
Rama latente: diámetro en el tercio central	RLD	Muy pequeño (1), pequeño (3), medio (5), grande (7), muy grande (9)
Rama latente: pigmentación antocianina	RLA	Ausente o muy débil (1), débil (3), media (5), fuerte (7)

Rama latente: número de ramas	RLR	Bajo (3), medio (5), alto (7)
Rama latente: distribución predominante de las ramas	RLP	Solo en el tercio superior (1), solo en la primera mitad (2), en toda la longitud (3)
Rama latente: sección transversal	RLT	Redondeada (1), redondeada a angular (2), angular (3), angular acanalada (4), acanalada (5)
Rama latente: espinas	RLE	Ausentes (1), presentes (9)
Rama latente: número de espinas	RLS	Ausente o muy bajo (1), bajo (3), medio (5), alto (7), muy alto (9)
Espina: tamaño	ETA	Sin espinas (1), pequeño (3), medio (5), grande (7), muy grande (9)
Espina: postura del ápice en relación con la rama	EPO	Hacia arriba (1), hacia afuera (2), hacia abajo (3), sin espinas (4)
Brote joven: pigmentación antocianina	BJP	Ausente a muy débil (1), débil (3), media (5), fuerte (7)
Brote joven: intensidad del color verde	BJI	Claro (3), medio (5), oscuro (7)
Brote joven: densidad de la rama pilosidad glandular	BJD	Ausente a baja (1), media (2), alta (3)
Foliolo superior: longitud	FSL	Corta (3), media (5), larga (7)
Foliolo superior: anchura	FSA	Estrecha (3), media (5), ancha (7)
Foliolo superior: lobulados	FSB	Ausente (1), presente (9)
Foliolo superior: forma en la sección transversal	FST	En forma de U (1), en forma de V (2)
Foliolo superior: ondulado del borde	FSO	Ausente a muy débil (1), débil (2), fuerte (3)
Foliolo superior: abullonado entre las venas	FSV	Muy débil (1), débil (3), medio (5), fuerte (7), muy fuerte (9)
Foliolo: tipo de incisión	FSI	Serrada (1), biserrada (2)

del margen		
Foliolo: profundidad de las incisiones	FSP	Poco profunda (3), media (5), profunda (7), muy profunda (9)
Hoja: número predominante de folíolos	HNO	Tres (1), cinco (2), siete (3)
Hoja: Tipo	HTY	Imparipinnada (1), intermedia (2), palmada (3)
Hoja: intensidad del color verde del haz	HIN	Claro (3), medio (5), oscuro (7)
Hoja: brillo del haz	HBR	Débil (3), medio (5), fuerte (7)
Pecíolo: tamaño de las estipulas	PTA	Pequeño (3), medio (5), grande (7)
Flor: diámetro	FLD	Muy pequeño (1), pequeño (3), medio (5), grande (7), muy grande (9)
Flor: color del pétalo	FLC	Blanco (1), blanco con trazas de violeta (2), rosáceo (3).
Fructificación lateral: longitud	TLL	Corta (3), media (5), larga (7), muy larga (9)
Fruto: longitud	TLO	Corta (3), media (5), larga (7), muy larga (9)
Fruto: anchura	TAN	Estrecha (3), media (5), ancha (7), muy ancha (9)
Fruto: relación longitud/anchura	TRE	Pequeña (3), media (5), grande (7), muy grande (9)
Fruto: número de drupas	TND	Bajo (3), medio (5), alto (7), muy alto (9)
Fruto: tamaño de la drupa	TFO	Muy pequeño (1), pequeño (3), medio (5), grande (7)
Fruto: forma en sección longitudinal	TEO	Circular (1), elíptica (2), oval estrecha (3), oval media (4), cónica alargada (5), oblonga (6)
Fruto: color	TCO	Rojo (1), púrpura rojizo (2), negro rojizo (3), negro azulado (4), negro (5)
Época de la brotación de la yema foliar	NEP	Muy temprana (1), temprana (3), media (5), tardía (7)
Época de comienzo de la floración en la rama del año anterior	ECF	Muy temprana (1), temprana (3), media (5), tardía (7), muy tardía (9)

Época de comienzo de madurez del fruto en la rama del año anterior	NFR	Muy temprana (1), temprana (3), media (5), tardía (7), muy tardía (9)
--	-----	---

Los descriptores que se evaluaron durante el invierno fueron:

Planta:

- **Porte:** Este carácter se evaluó durante la latencia invernal de acuerdo en la escala numérica correspondiente al tipo, forma y hábito de crecimiento, y que va desde plantas erectas hasta plantas rastreras (Figura 14).



Figura 14. Ilustraciones del hábito de crecimiento de la planta

- Longitud. Este carácter se evaluó midiendo con una cinta métrica la longitud de la rama.
- Diámetro (en el tercio central): este carácter se evaluó midiendo el diámetro con un vernier y comparación de ramas. Y asignar su escala correspondiente que va desde muy pequeño a muy muy grande.
- Pigmentación antocianina: este carácter se evaluó mediante observación y comparación de acuerdo a su escala correspondiente que va desde ausente o muy débil hasta fuerte.
- Distribución predominante de las ramas: la distribución se evaluó mediante observación de acuerdo a su escala correspondiente.

- Sección transversal: en este descriptor se evaluó mediante una realización de corte en forma transversal el tercio central se observó de acuerdo a su escala que va desde redonda hasta acanalada.

Espinas: se observó de acuerdo a su escala correspondiente de ausentes y presentes.

- Número de espinas: este descriptor se evaluó mediante conteo de espinas y observación de tres ramas seleccionadas de cada individuo y así asignar su escala correspondiente que va desde muy bajo hasta muy alto.
- Tamaño: este descriptor se evaluó midiendo con un Vernier el tamaño de la espina posterior se asignó su escala

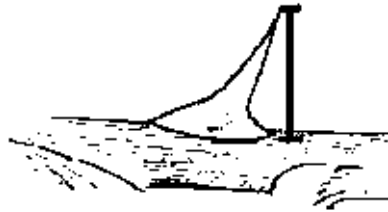


Figura 15. Ilustraciones del tamaño de la espina tallo (Romoleroux, 1996)

- Postura del ápice en relación con la rama: este descriptor se evaluó de acuerdo a su escala correspondiente de hacia arriba hasta sin espinas, mediante observación y comparación en tres ramas ejemplares por individuo (Figura 16).

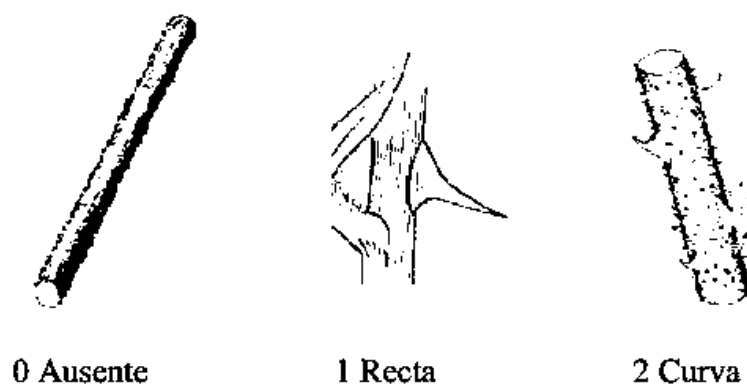


Figura 16. Ilustraciones de la forma de la espina en la hoja (Romoleroux, 1996)

Las observaciones de los descriptores que se realizaron durante el crecimiento y antes de la floración fueron:

Brote joven:

- Pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido): en este descriptor se realizó mediante observación de acuerdo a su escala que va desde ausente o muy débil hasta fuerte.
- Intensidad del color verde: en este descriptor se evaluó mediante observación y comparación tomando en cuenta de tres a cinco brotes por individuo para asignar su escala correspondiente que va desde claro a oscuro
- Densidad de pilosidad glandular: este descriptor se observó de acuerdo a su escala que va de ausente o baja hasta muy alta (Figura 17).

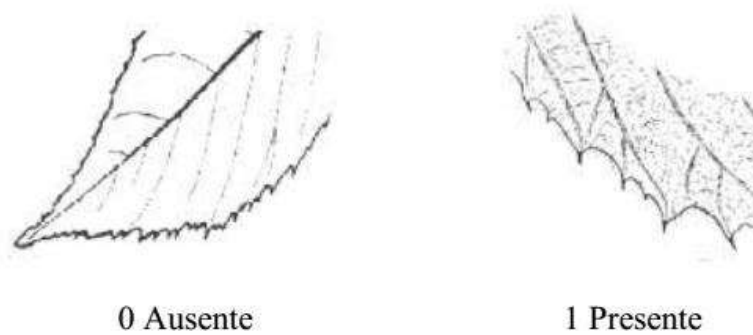


Figura 17. Ilustraciones de las vellosidades en la hojas (Romoleroux, 1996)

Las observaciones de los descriptores morfológicos que se realizaron durante la floración fueron relacionados con:

- Número de ramas nuevas: en este carácter se evaluó de manera manual contabilizando cada una de las ramas por individuo y así asignar su escala correspondiente que va desde muy bajo hasta muy alto.
- Foliolo superior: Longitud, anchura, lobulada, ondulación del borde, foliolo: profundidad de las incisiones: estos descriptores se evaluaron midiendo con un vernier posteriormente transformándolos a datos cualitativos para asignar sus escalas correspondientes, se realizó tomando de 3 a 5 folíolos superiores de 5 ramas seleccionadas por individuo.
- Forma en sección transversal: se observó la forma del foliolo y asignó su escala.
- Abullonado entre las venas: este descriptor se realizó mediante observación de acuerdo a su escala.
- Hoja: Tipo, intensidad color verde del haz, brillo del haz: estos descriptores se evaluaron de acuerdo a sus escalas. Se observaron cinco hojas, de tres a cinco ramas seleccionadas por individuo (Figura 18).

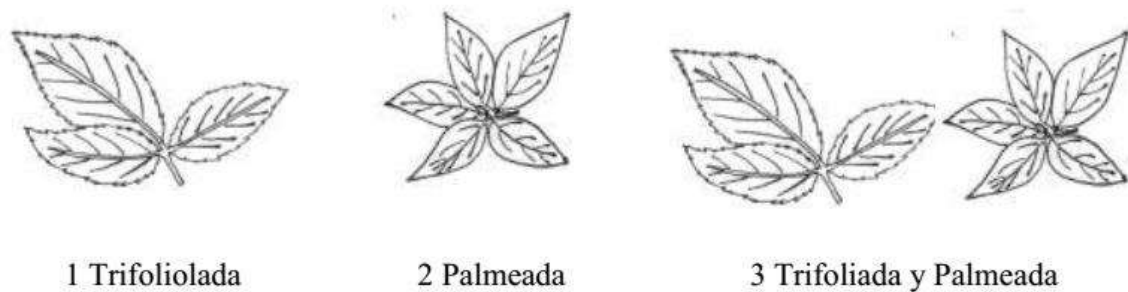


Figura 18. Ilustraciones del tipo de hoja (Romoleroux, 1996)

- Peciolo: Tamaño de las estipulas: este descriptor se evaluó de acuerdo a su escala, que va desde pequeño hasta grande. Se evaluaron cinco estipulas, de tres a cinco ramas seleccionadas por individuo (Figura 19).

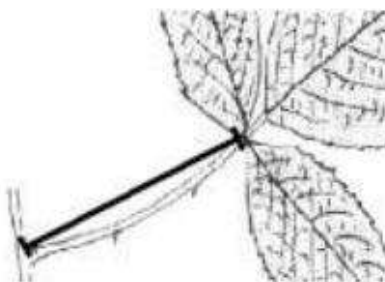


Figura 19. Ilustraciones de la longitud del peciolo (Romoleroux, 1996)

- Flor: Diámetro: este descriptor se evaluó con un Vernier; después se le asignó su escala
- Color de pétalo: se observó de acuerdo a su escala correspondiente, que va desde blanco hasta rosáceo y considerando de tres a seis flores por individuo.

Las observaciones de los descriptores relacionados con el fruto se realizaron durante la segunda, tercera cosechas; las características evaluadas fueron:

- Fructificación lateral: Longitud: se midió con una cinta métrica en tres racimos por planta.
- Fruto: Longitud, anchura, relación longitud/anchura: estos caracteres se evaluaron tomando las mediciones del fruto con un vernier 5 frutos por planta (Figura 20).

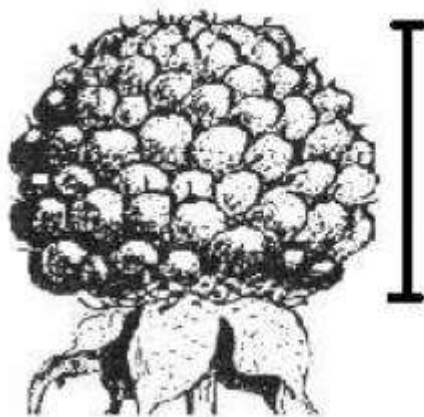


Figura 20. Ilustración de la longitud del fruto (Romoleroux, 1996)

- Número de drupas: este descriptor se evaluó de acuerdo a su escala correspondiente al contabilizar el número de drupas de 5 frutos de distintos racimos por individuo.
- Tamaño de la drupa: este carácter se observó de acuerdo a su escala correspondiente que va desde muy pequeño a grande.
- Forma en sección longitudinal: este carácter se evaluó de acuerdo a su escala que va desde circular hasta oblonga se observó 5 frutos de distintos racimos por individuo (figura 21).

- Color: este carácter se evaluó en etapa madurez de cosecha o consumo cuando las drupelas se encontraban completamente negras.

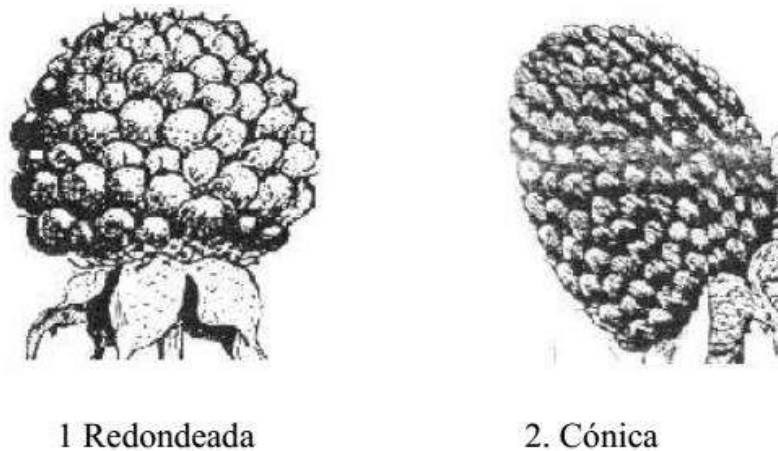


Figura 21. Ilustración de la forma del fruto (Romoleroux, 1996)

- La época de comienzo de la yema foliar: se observó de acuerdo a una escala que va desde muy temprana hasta tardía. ,
- Época de comienzo de la floración en la rama del año en curso: este carácter se realizó cuando se presentó un 10 % de los botones florales abiertos, se observó de acuerdo a su escala correspondiente que va desde temprano hasta muy tarde.
- Época de comienzo de la madurez del fruto: este carácter se realizó cuando el fruto se pudo desprender de la planta con facilidad.

Análisis de parámetros fisicoquímicos, cuantificación de fenoles totales y niveles de ploídia en zarzamora (*Rubus* spp.)

Extractos:

De cada fruto deshidratado (Figura 22) se tomó 1 g y se maceró; cada muestra se depositó en un matraz Erlenmeyer, luego se agregó metanol acidificado (0.01% HCl), seguido de agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Cada muestra se filtró en papel Whatman, luego se centrifugó a 500 rpm durante 3 horas y el sobrenadante se filtró en una membrana nylon con un poro de 0.22 μ l, y por último, se guardó en frasco ámbar a -20°C hasta su análisis.



Figura 22. Esquema de los procedimientos del análisis de la cuantificación de polifenoles, parámetros fisicoquímicos y niveles de ploídia de *Rubus spp*

Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación de los polifenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu para lo cual se siguió con base al protocolo establecido por Estupiñán *et al.* (2011), con algunas modificaciones de acuerdo a Singleton *et al.* (1999). El reactivo Folin-Ciocalteu está formado por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y

fosfomolibdico, la cual se reduce en presencia de fenoles y forma óxidos azules de tungsteno y molibdeno.

Se prepararon cinco diluciones del extracto metanólico (Figura 23) y del estándar, de cada una de estas diluciones se depositaron 50 µl en un tubo de ensayo; se agregaron 550 µl de agua destilada, seguido con 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:10); luego se agregaron 300 µl de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% y se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Al finalizar la reacción, se tomó lectura de la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro UV-Vis marca JENWAY 6305, utilizando un blanco de reactivo con metanol. Para reportar los resultados, se construyó una curva estándar de ácido gálico marca SIGMA, partiendo de una solución stock a una concentración de 0.5 mg/mL. Los resultados se expresaron como µg equivalentes de ácido gálico (EAG/µL).

Peso de frutos. Para registrar el peso promedio de los frutos (Figura 24), se consideraron diez grupos con 3 frutos cada uno; el peso se registró en una balanza analítica.

pH. Para esta medición se obtuvo el jugo de 10 g de frutos, éstos se maceraron con 50 ml de agua destilada. El pH se midió con potenciómetro.

Sólidos solubles. En esta determinación se tomaron cinco frutos, los cuales se molieron en un mortero. Del jugo extraído se tomó una gota, la cual se colocó en un refractómetro. Los resultados se expresaron como grados Brix a 20 °C o porcentaje de sólidos solubles. (AOAC, 2000).

Acidez titulable. Este factor se evaluó de acuerdo al método oficial de la AOAC (1996), por titulación con hidróxido de sodio (NaOH). Para ello, se extrajo el jugo de 10 g de frutos; el jugo fue colado y diluido en 50 ml agua destilada, del extracto diluido se tomó una alícuota de 15 ml y se agregaron tres gotas de fenolftaleína al

1 %. La muestra se tituló con NaOH al 0.1 N; los porcentajes se expresaron como porcentaje de ácido cítrico.

Número de drupas por fruto. Se registró el número promedio de los frutos, tomando tres frutos de cada uno de los tratamientos.

Niveles de ploidía

De las plantas establecidas en el invernadero, se tomaron estacas con hojas, las cuales fueron hidratadas para evitar daños tras su traslado al Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO), de la Universidad Autónoma Chapingo, en Morelia.

El aislamiento de los núcleos fue adaptado del trabajo de Arumuganathan y Earle (1991). Se preparó un buffer solución "stock" compuesto de 10 mM de MgSO_4 , 50 mM de KCl y 5 mM de HEPES, a un pH de 8.0 y tritón al 10% 100-X (w/v). Se preparó un tampón y al buffer se le adicionó 20 g.L⁻¹ PVP-10 y 1 g.L⁻¹ mercaptoethanol y 28 mL.L⁻¹ de tritón 100-x.

Se pesaron de 30-50 mg de tejido tierno y sano (Figura 23), sin nervadura ni borde de hojas. Previamente la hoja fue lavada (con agua y jabón líquido, enjuagada agua destilada y secada); el tejido se colocó en una caja Petri, se agregó 1 ml de buffer de extracción de núcleos, se realizó un picado fino de aproximadamente 5 mm (como picar cilantro), se agregaron 20 microlitros de mercapto-ethanol inmediatamente y se mezcló (ocasionalmente) durante el reposo. En proximadamente 3 minutos, se filtró la muestra (con filtros de nylon de 30 micras de apertura), para retirar los restos de tejido; en seguida se agregaron 20 microlitros de RNAasa y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente; luego se agregaron 25 microlitros del flourocromo PI (yoduro de propidío, intercalante de ADN el cual, tras ser excitado con la luz ultravioleta emitida en luz visible, proporciona una medida cantidad de ADN que se correlaciona con la

ploidía). Las muestras se cubrieron con aluminio y se incubaron por 20-30 minutos en hielo. , Todo el proceso se realizó en hielo. Como muestra control se utilizó al cerezo agrio (*Prunus mahaleb*).

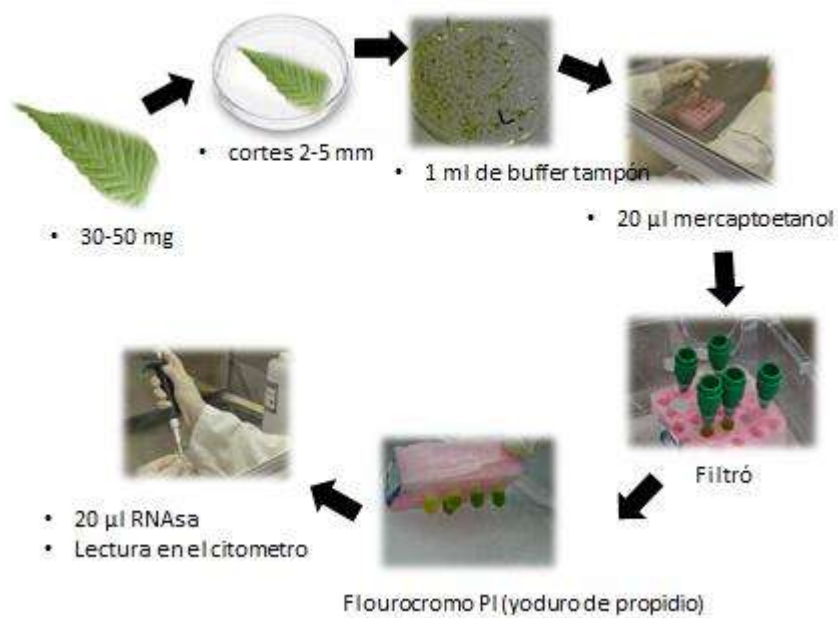


Figura 23. Esquema del análisis de ploídia

Las lecturas se tomaron con un citómetro (marca Attune) y la longitud de onda de emisión laser se ajustó a 488 nm. Cada muestra se analizó a una velocidad de datos de 100 a 150 núcleos por segundo.

Análisis de datos

De los datos obtenidos en cada una de las mediciones se realizó una matriz básica de datos. Para ello, se utilizó un análisis de componentes principales con el programa estadístico STATISTICA (StatSoft, Inc., 2004), versión 7. Para los parámetros fisicoquímicos, cuantificación de fenoles y niveles de ploidía se realizó un análisis ANOVA, con la comparación de medias de Tukey mediante el programa estadístico SAS.JMP.v6

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el herbario del instituto de ecología A. C. Centro Regional del Bajío de Pátzcuaro Michoacán, las muestras se clasificaron como: *Rubus cymosus*, *R. humistratus* Steud, *R. coriifolius*, *R. sapidus* Schltld y *R. adenotrichos* Schltld. La figura 24 a la 28 se muestra las características morfológicas que conforma cada especie.



Figura 24. Esquema de la especie de *R. adenotrichus*



Figura 25. Esquema de la especie de *R. sapidus*



Figura 26. Esquema de la especie de *R. cymosus*



Figura 27. Esquema de la especie de *R. coriifolius*

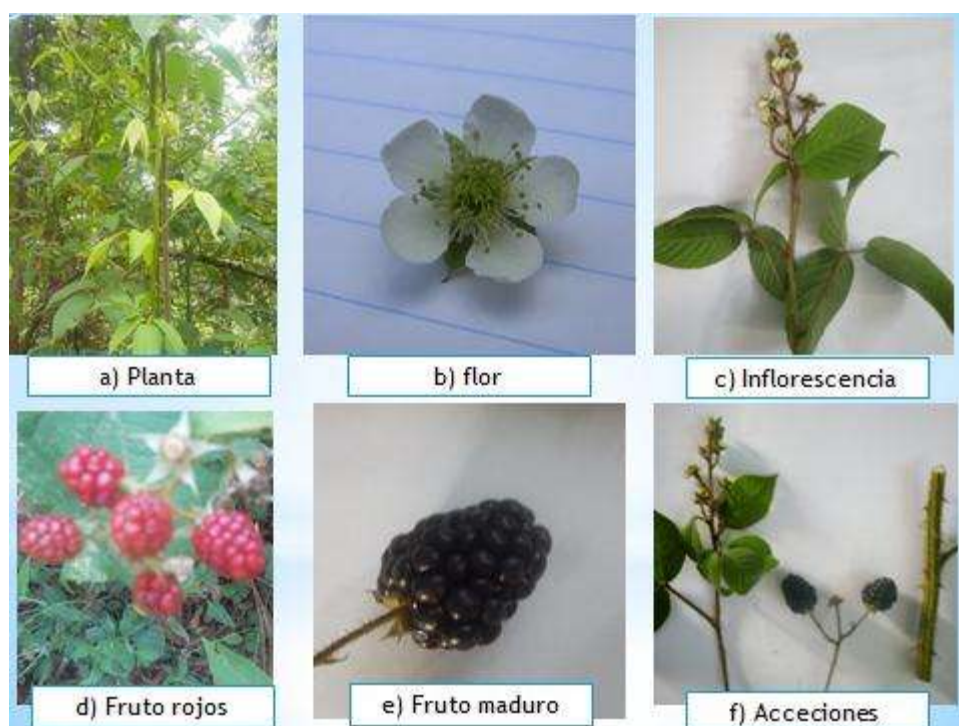


Figura 28. Esquema de la especie de *R. humistratus*

De las 41 descriptores morfológicos evaluados, se descartaron cuatro de ellos debido a que éstas no presentaron variabilidad. No fueron discriminantes los parámetros siguientes: rama latente: espinas (RLE), Espina: postura del ápice en relación con la rama (EPO), Foliolo superior: lobulados (FSB), foliolo superior: forma en la sección transversal (FST). Se evaluaron 37 descriptores en el análisis de componentes principales

Análisis de las variables morfológicas

Análisis de componentes principales (ACP) los primeros cuatro componentes explicaron el 70.23 de la variabilidad total, sobresaliendo el primer CP1 con 23.55% total de la variación, seguido de 22.36 %, 10.81 %, 6.92% y 6.27% para el segundo, tercero, cuarto y quinto componente, respectivamente (Figura 29). El comportamiento se explica por la variabilidad morfológica y genética existente en el género *Rubus*, en el que se encuentran especies desde diploides hasta dodecaploides; ello debido principalmente a la apomixis y la heterocigosis (Marulanda et al., 2007)

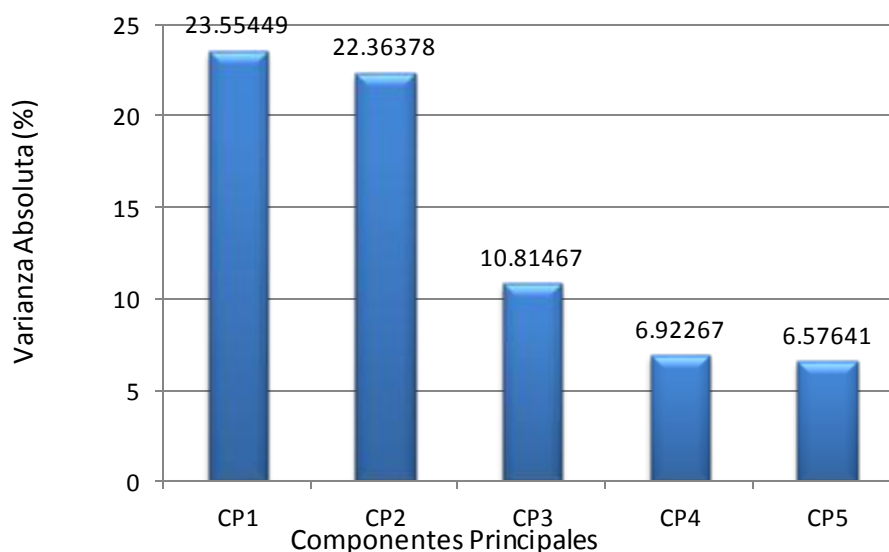


Figura 29. Valores de variación de los diferentes componentes

En la Cuadro 5 se observó que la varianza asociada con cada componente principal es diferente y decrece en orden. El primer componente explica el 23.55 % de la varianza total, el segundo el 22.36 % y así sucesivamente, hasta que toda la variabilidad queda distribuida diferencialmente entre los 37 componentes.

Cuadro 5. Valores propios y proporción de la varianza en cada componente de forma decendente.

Componentes principales	Valor propio	Proporción de la varianza total explicada	
		Absoluta	Acumulada
CP1	8.715162	23.55449	23.5545
CP2	8.274598	22.36378	45.9183
CP3	4.001428	10.81467	56.7329
CP4	2.561388	6.92267	63.6556
CP5	2.433272	6.57641	70.2320
CP6	2.035516	5.50139	75.7334
CP7	1.777894	4.80512	80.5385
CP8	1.456811	3.93733	84.4759
CP9	1.270117	3.43275	87.9086
CP10	0.908322	2.45492	90.3635
CP11	0.765017	2.06761	92.4311
CP12	0.540548	1.46094	93.8921
CP13	0.365143	0.98687	94.8790
CP14	0.338766	0.91558	95.7945
CP15	0.280197	0.75729	96.5518
CP16	0.229644	0.62066	97.1725
CP17	0.193346	0.52256	97.6951
CP18	0.168336	0.45496	98.1500
CP19	0.132304	0.35758	98.5076
CP20	0.109854	0.29690	98.8045

CP21	0.090692	0.24511	99.0496
CP22	0.074829	0.20224	99.2518
CP23	0.070707	0.19110	99.4429
CP24	0.047901	0.12946	99.5724
CP25	0.045709	0.12354	99.6959
CP26	0.029913	0.08085	99.7768
CP27	0.022890	0.06186	99.8387
CP28	0.018573	0.05020	99.8889
CP29	0.017861	0.04827	99.9371
CP30	0.011535	0.03118	99.9683
CP31	0.005913	0.01598	99.9843
CP32	0.002959	0.00800	99.9923
CP33	0.001504	0.00406	99.9963
CP34	0.000963	0.00260	99.9989
CP35	0.000389	0.00105	100.0000

Para la selección de los valores propios significativos se escogió el criterio de Káiser, ya que éste se adapta bien a la finalidad del presente análisis y, por consiguiente, la descripción de los resultados se hace en función de los cinco componentes que explicaron más 70% de la varianza total.

En la Figura 30 también se observa que las variables más vinculadas en forma positiva con el primer eje. Foliolo superior: ondulado del borde (FSO), foliolo superior: longitud (FSL), hoja: número predominante de foliolos (HNO), fructificación lateral: longitud (TLL), y en forma negativa; rama latente: distribución predominante de las ramas (RLP), fruto: relación longitud/anchura (TRE), Brote joven: pigmentación antocianina (BJP). Brote joven: intensidad del color verde (BJI). Las variables más vinculadas al segundo eje en sentido positivo fueron: foliolo profundidad de las incisiones (FSP), flor: diámetro (FLD), rama latente

(RLR), hoja: brillo del haz (HBR), peciolo: tamaño de las estipulas (PTA) y en sentido negativo época de la brotación de la yema foliar (NEP), flor: color del pétalo (FLC), espina (ETA), fruto: número de drupas (TND), fruto: tamaño de la drupa (TFO), brote joven: densidad de la rama pilosidad glandular (BJD).

La proyección opuesta de los foliolos: longitud, ondulados y número predominante de foliolos sobre el primer eje en relación con las variables rama latente: distribución, flor: diámetro, fruto: relación longitud/anchura, brote joven: pigmentación antocianica, significa que las accesiones de *Rubus* se desarrollan con una intensidad similar.

También se puede observar el grado de asociación entre las variables está determinado por la separación angular que forman sus proyecciones. De acuerdo con la separación angular, la mejor asociación está constituida por espina: tamaño (ETA) y planta: número de ramas nuevas (PNR), Folíolo profundidad de las incisiones (FSP) Y Flor: diámetro (FLD), Rama latente: pigmentación antocianina (RLA) Y y Fruto: relación longitud/anchura (TRE).

Las distancia al origen indican que las variables época de la brotación de la yema foliar (NEP), folíolo: profundidad de las incisiones (FSP); flor: diámetro (FLD) y fruto: relación longitud/anchura (TRE) son las variables más importantes.

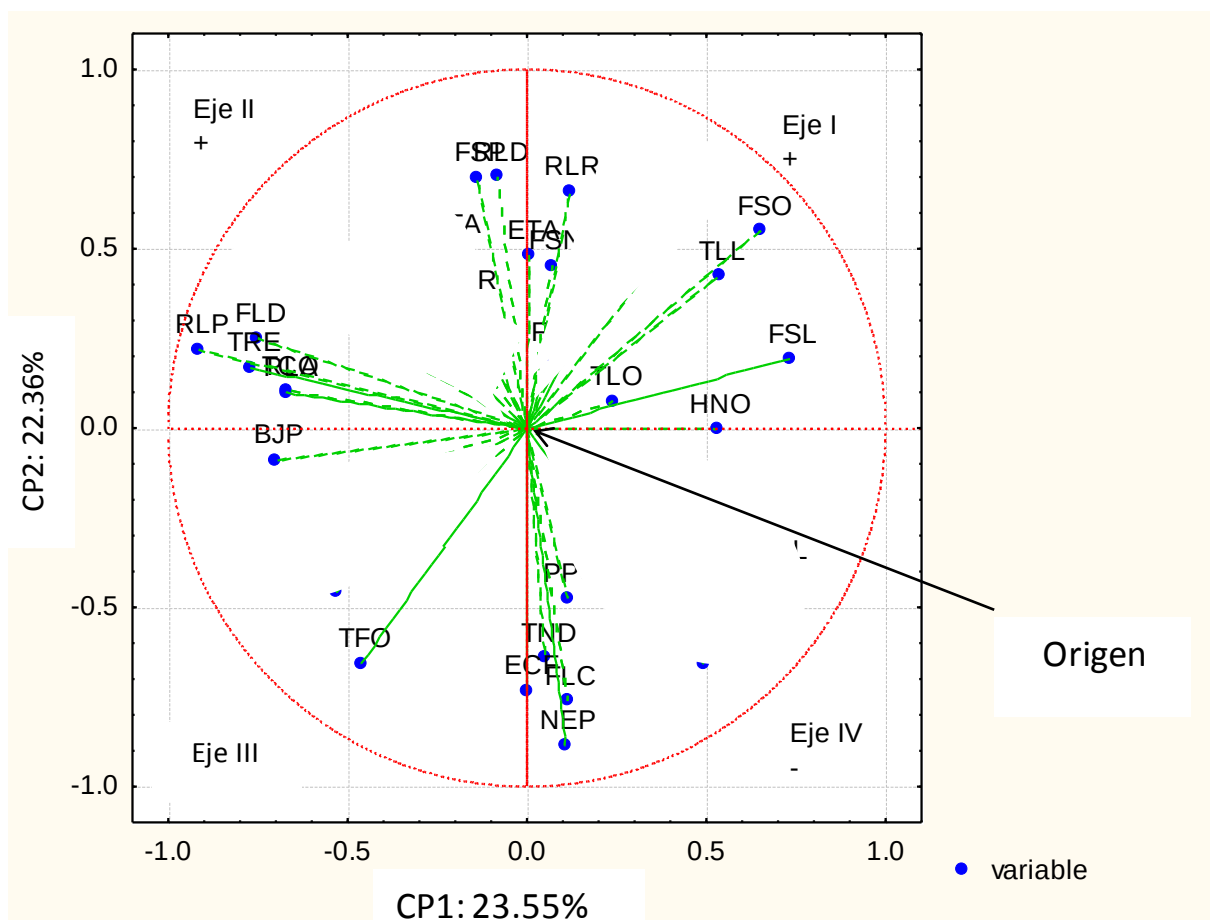


Figura 30. Distribución de las variables originales de las acepciones del primero y segundo componente

Componente 1: de los 37 descriptores evaluados los más discriminantes fueron 12 descriptores. Rama latente: distribución predominante de las ramas (RLP), época de comienzo de la madurez del fruto (NFR), fruto: relación longitud/anchura (TRE), flor: diámetro (FLD), foliolo superior: longitud (FSL), fruto: tamaño de la drupa (TTA), brote joven: intensidad del color verde (BJI), brote joven: pigmentación antocianica (BJP), rama latente: longitud (RLL), fruto: color (TCO), foliolo superior: ondulado del borde (FSO) y fructificación lateral: longitud (TLL) observándolos en el Cuadro 6.

Componente 2 fueron siete los descriptores mas discriminantes: época de la brotación de la yema foliar (NEP), fruto: color (TCO), flor: color del pétalo (FLC), brote joven: densidad de la rama pilosidad glandular (BJD), rama latente: espinas (RLD), foliolo profundidad de las incisiones (FSP) y época de comienzo de la floración en la rama del año anterior (ECF).

Estas características permitieron discriminar en gran medida las diferentes especies, la mayoría de las cuales mostraron flores blancas; sin embargo, *R. adenotrichus* posee pétalos de color blanco con franjas rosas. Estas características pueden ser útiles en futuros programas de mejoramiento, ya que, según (Marcano, 2007), las flores que poseen colores vistosos atraen a insectos polinizadores, y como la flor de la zarzamora es parcialmente autoestéril, es indispensable que haya polinización cruzada, preferiblemente estomófila (Botero, 1995). Se observó que las especies *R. adenotrichus* y *R. sapidus* se diferencian de *R. humistratus* en el color de pubescencia, ya que la primera presenta un color vino tinto, mientras que la segunda presenta un color verde limón.

Componente 3: resultaron cinco descriptores los mas discriminantes planta: número de ramas nuevas (PNR), porte de la planta (PPO), rama latente: número de espinas (RLS), espina: tamaño (ETA), foliolo superior: anchura (FSA). Componente 4 son cuatro descriptores los que mas aportaron información peciolo: tamaño de las estipulas (PTA), fruto: longitud (TLO), foliolo profundidad de las incisiones (FSP) y fruto: número de drupas (TND). Componente 5 se presentan cuatro descriptores los más discriminantes (RLA), (RLT), foliolo superior: longitud (FSI) Y (HIN).

Cuadro 6. Valores propios de los descriptores más discriminantes

Descriptores	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
PPO			0.584701	-0.475096	
PNR			0.719152		
RLL	0.702582				
RLD		0.700578			

RLA					-0.327889
RLR	0.117472	0.661099		-0.345621	
RLP			0.066537		
RLT					-0.515738
RLS			0.702764		
ETA			-0.663381		
BJP	-0.701877				-0.480631
BJI	-0.704028				
BJD		-0.656168		-0.317807	
FSL	0.732279				
FSA					
FSO	0.653020		-0.053539		-0.368767
FSN					
FSI					-0.540393
FSP		0.698927		-0.379834	
HNO					
HTY					
HIN					-0.413220
HBR		0.750953			
PTA				-0.482757	
FLD	-0.750125				
FLC		-0.761399			
TLL					
TLO				-0.701007	
TAN				-0.472802	
TRE	-0.769885			-0.335417	
TND				-0.337886	
TTA	-0.709272				
TFO					
TCO	-0.670195				-0.431828
NEP		-0.885122			
NFR	-0.820492				
ECF		-0.730500			

En el Cuadro 7 se presentan los resultados con los descriptores ordenados en forma descendente. En general, los descriptores: distribución predominante de las ramas latentes (RLP), época de la brotación de la yema foliar (NEP), fruto: relación longitud/anchura (TRE) del fruto y porte de la planta (PPO) son más importantes y

discriminatorias que las variables sección transversal (RLT) e intensidad del color verde (HIN) de la hoja

Cuadro 6. Proporción de la varianza explicada por cada descriptor de forma decendente sobre los cuatro componentes principales en la caracterización de *Rubus*

Descriptor	Componentes principales				Proporción de la varianza
	1	2	3	4	
RLP	0.83732382	0.0475903	0.00442717	1.46E-05	0.88935587
NEP	0.01094262	0.78344095	0.01236366	0.02409418	0.83084142
TRE	0.59272291	0.02835418	0.08781028	0.11250456	0.82139194
PPO	0.01311666	0.22537807	0.34187526	0.22571621	0.8060862
NFR	0.67320712	0.06146631	0.02427644	0.03749258	0.79644245
BJD	0.24100736	0.43055644	0.00967233	0.10100129	0.78223742
HTY	0.28303358	0.21012139	0.27062157	0.01767623	0.78145277
FLC	0.01274415	0.57972844	0.18024695	0.00099338	0.77371292
FSO	0.42643512	0.30234162	0.00286642	0.02725801	0.75890118
BJI	0.49565542	0.12321504	0.09611054	0.03598457	0.75096558
RLL	0.49362147	0.16869585	0.03879994	0.04410462	0.74522187
FLD	0.56268752	0.06245301	0.09796587	0.00067345	0.72377985
TTA	0.50306677	0.20177345	0.00308136	0.01029738	0.71821896
TFO	0.21367044	0.43022449	0.0043274	0.06499491	0.71321724
ETA	2.76E-05	0.2325072	0.44007435	0.01346621	0.68607536
HBR	0.11110156	0.56393041	0.00816186	0.00277181	0.68596563
FSP	0.01937803	0.48849895	0.01478802	0.14427387	0.66693887
PNR	0.02967592	0.11752555	0.5171796	0.00144872	0.66582979
TND	0.00280889	0.41039142	0.13319945	0.11416695	0.66056672
RLR	0.01379967	0.43705189	0.07974807	0.11945388	0.6500535
TAN	0.27224498	0.08947577	0.04496944	0.22354173	0.63023192
FSL	0.53623253	0.03664238	0.00209023	0.05415022	0.62911536
BJP	0.49263132	0.00776989	0.02494725	0.09048124	0.61582971
TLL	0.28713308	0.1797548	0.03958866	0.10194163	0.60841818

RLD	0.0065309	0.49080953	0.09255589	0.00849863	0.59839496
RLA	0.45020074	0.01009563	0.07937743	0.03059981	0.5702736
RLS	0.01557155	0.03005924	0.49387724	0.02868958	0.56819761
PTA	0.04584737	0.24815641	0.03018316	0.23305432	0.55724126
TLO	0.05739953	0.00571551	0.00191441	0.49141081	0.55644027
ECF	7.28E-06	0.53363025	0.00369008	0.01751335	0.55484096
ECF	7.28E-06	0.53363025	0.00369008	0.01751335	0.55484096
FSI	0.11845024	0.19763448	0.19807751	0.01404675	0.52820899
HNO	0.2790787	1.68E-05	0.08960683	0.06346419	0.43216652
TCO	0.44916134	0.01039727	0.00891438	0.00261377	0.47108675
FSN	0.00514534	0.20557247	0.17604654	0.03419023	0.42095457
RLT	0.06121913	0.19446601	0.0737997	0.01493235	0.34441719
HIN	0.09713445	0.08961761	0.05975189	0.05103804	0.29754199
FSA	0.00514591	0.03954092	0.21443938	0.00283397	0.26196018

En la Figura 31 se muestra la dispersión de las poblaciones en un plano formado por los componentes 1 y 2 (45.91% de la variabilidad total), agrupa las colectas de zarzamora silvestres y la variedad comercial en seis grupos. Con respecto al CP1 la variedad comercial Tupy se encuentran alejadas de la media registrando valores positivos; asimismo la especie *R. adenotrichus* presenta valores negativos y se encuentra alejada de la media. La especie *R. humistratus* se ubican en la media general de dicho componente. En relación al CP2 *R. Coriifolius* se ubica en la zona positiva y se encuentra alejada del origen. *R. sapidus* y *R. cymosus* se ubican en forma negativa se encuentra mas alejada del origen *R. cymosus*. Se observa como se acerca una especie de otra dependiendo de sus características mas discriminantes. Referente a *R. corrifolius* y *R. sapidus* presentan tallos angulares; en contraste, las especies *R. adenotrichus*, *R. cymosus* y *R. humistratus* presentaron tallos acanalados. La pilosidad del tallo se presentó con mayor frecuencia en la especie *R. adenotrichus*, seguido por *R. sapidus* y *R. humistratus*, mientras que *R. cymosus* y *R. coriifolius* presentaron baja pilosidad. (Monasterio et al.,2002) reportan que en las especies de *Rubus*, la

superficie de las distintas partes de la planta están cubiertas de tricomas y espinas, cuyo número y forma varían de una especie a otra, modificándose en función de los factores ecológicos y exposición a la radiación solar.

En relación al número de folíolos por hoja, las especies *R. coriifolius*, *R. sapidus* y *R. cymosus* presentaron hojas pentafoliadas, mientras que en las demás especies las hojas fueron trifoliadas. Estos resultados concuerdan con los de Cancino-Escalante *et al.* (2011), quienes encontraron que *R. adenotrichus* presentan tallos acanalados, folíolos ovados, de 3 a 5 folíolos y ápices acuminados.

El color y la forma del pétalo permitieron diferenciar las especies *R. cymosus*, *R. coriifolius* y *R. sapidus*, las cuales presentaron pétalos de color blanco; en contraste, *R. adenotrichus* presentó pétalos blancos con trazas de color rosa. En cuanto a los caracteres del fruto, *R. adenotrichus*, *R. sapidus*, *R. cymosus* y *R. humistratus* presentaron numerosos drupas por polidrupa (50 a 100), a diferencia de las especies *R. coriifolius*, presentade 6 a 30 drupas por cada polidrupa. Por lo tanto, *R. adenotrichus* y *R. sapidus* presentan importantes caracteres reproductivos, los cuales se pueden aprovechar para mejoramiento genético, debido que coinciden con el número de drupas por polidrupa en materiales comerciales de zarzamora (Zamorano *et al.*, 2007); sin embargo, el número de drupas dependerá de las localidades y materiales desarrollados, por ello, el número y la constitución de las drupas es relevante en la caracterización en las especies de zarzamora. Chargoy (2004) afirma que los incrementos en la productividad de los cultivos se logran estableciendo primero la identidad y el peso de aquellas variables que más aportan al rendimiento, para incluirlas en los programas de mejoramiento.

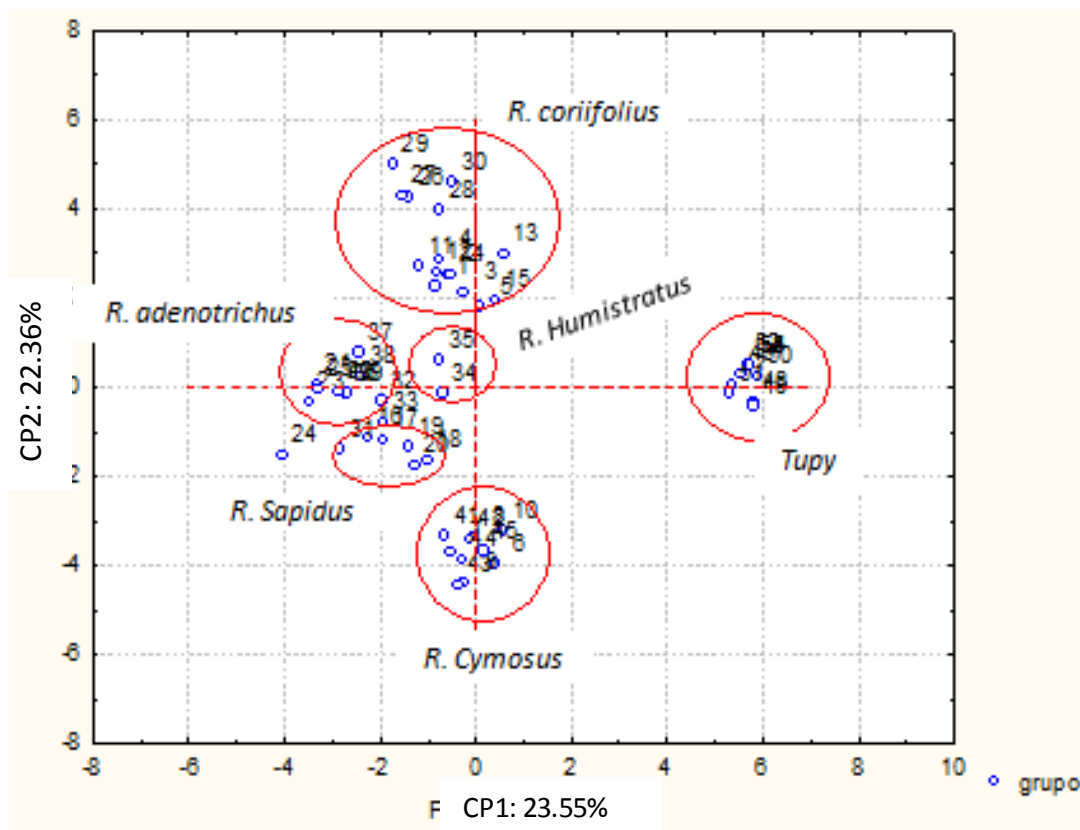


Figura 31. Plano de distribución de las especies clasificadas de *Rubus* spp

La caracterización morfológica ha permitido reconocer las principales características que distinguen a cada una de las especies silvestres y variedades. Moreno *et al.* (2011) mencionan que la colección, caracterización y evaluación del germoplasma son tareas prioritarias para la conservación, el mejoramiento y la obtención de materiales sobresalientes con mejores características productivas.

Contenido de fenoles

El contenido más alto de fenoles fue obtenido en frutos de *Rubus adenotrichus* y *R. coriifolius*, con valores de 24.64 ± 1.3 y 23.64 mg equivalentes de ácido gálico (GAE/g) en el fruto. Se presentan mas altos que en la variedad comercial. Las especies que no presentaron diferencias significativas fueron *R. cymosus*, *R. sapidus* y la variedad comercial con valores de 16.95-17.72 mg EAG/g. Diversos investigadores (Seeram y col., 2006; Dai y col., 2007; Pantelidis y col; 2007) han estimado en contenido de compuestos fenólicos totales en un rango

de 12.1 a 23.5 mg equivalentes de AG/g en zarzamoras comerciales variedades Choktaw, Tupy y Thornless. La variación en el contenido de polifenoles en frutillas podría atribuirse al genotipo y exposición de la planta a estrés biótico y abiótico, tales como: temperatura, radiaciones solares, herbívoros e infecciones patogénicas (Kalt y col., 2001; Reyes-Carmona y col., 2005)

La Figura 32 y Cuadro 8 muestra el contenido de mg EAG/g encontrado en frutos de zarzamora en los diferentes sitios de colecta. Se ha reportado un contenido de fenoles de 29.54 ± 1.5 mg/g para la misma especie colectada en Veracruz, México (Martínez, 2011).

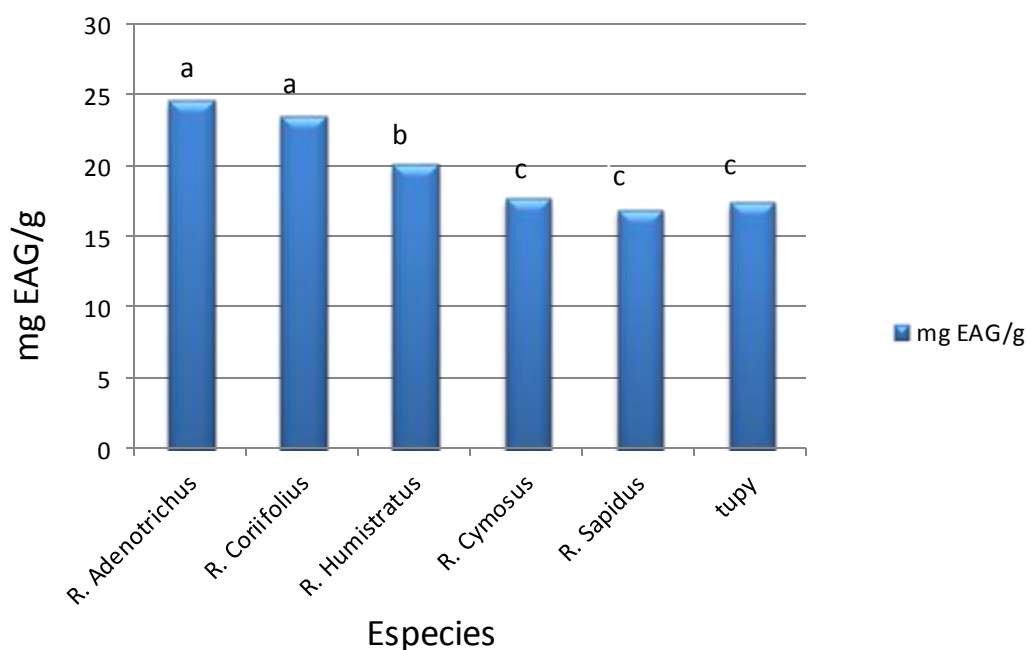


Figura 32. Comparación de medias del contenido mg EAG/g obtenidas en el análisis de varianza de las diferentes especies de *Rubus spp.* Diferencias significativas (Tukey; $p < 0.05$)

Estos datos son comparables con los obtenidos por Wang y Lin (2000), y por Pantelidis *et al.* (2007), quienes encontraron concentraciones de polifenoles de 13.47 a 17.03, y de 23.29 mg/g, respectivamente

Cuadro 7. Contenido mg EAG/g en las especies de *Rubus*

Especies	mg EAG/g
<i>R. adenotrichus</i>	24.6404 ^a
<i>R. coriifolius</i>	23.6409 ^a
<i>R. humistratus</i>	20.2169 ^b
<i>R. cymosus</i>	17.7211 ^c
<i>R. sapidus</i>	16.9564 ^c
<i>Tupy</i>	17.4271 ^c

Aunque el contenido de sustancias fenólicas es un indicativo de la actividad antioxidante de una muestra, es muy importante analizar el contenido de algunos tipos de fenoles con actividad antioxidante elevado, como es el caso de los flavonoides y específicamente antocianinas.

Análisis de los parámetros fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos se muestran en el Cuadro 9. En relación al contenido de sólidos solubles totales, *R. coriifolius* fue el material que presentó valores más altos, entre ellos el sabor más dulce, con el resto de las especies evaluadas, incluyendo a la variedad Tupy. La presencia de azúcares durante la maduración de los frutos define aspectos de calidad, así como de almacenamiento (Díaz, 2002). Estos datos son comparables con los obtenidos por (Salmeron, 2010) donde obtuvo valores de 7.6-12.4 (°Brix) en materiales silvestres.

Por otro lado, *R. adenotrichus* presentó 50-100 drupas por fruto, pero sin presentar diferencias significativas entre la variedad comercial. La cantidad de

drupas puede llegar hasta 110 en algunos materiales caracterizados morfológicamente (Zamorano *et al.*, 2007); sin embargo esto dependerá de la forma de los frutos redondos o alargados, este comportamiento se nota en el presente trabajo, ya que el menor número de drupas se presentó en *R. coriifolius*, corresponde a los frutos mas redondos; así mismo, el mayor número de drupas se presentó en aquellos más alargados en *R. adenotrichus*.

En relación al pH, *R. coriifolius*, *R. sapidus* y *R. adenotrichus* no presentaron diferencias significativas entre ellas. Estos resultados son comparables con los obtenidos por (Salmeron, 2010) con valores de pH 3.1-3.3.

En cuanto a la acidez titulable *R. adenotrichus* no presenta diferencias significativas con la variedad comercial (Figura 33). La presencia de ácidos orgánicos en los frutos es importante para que éstos mantengan su sabor característico, donde en general, uno o dos son los que predominan según la especie. Antes de la maduración los ácidos orgánicos están en alta cantidad, pero su contenido se reduce a medida que se desarrolla la maduración, y en particular, cuando inicia el aumento en azúcares libres. La reducción del contenido de los ácidos orgánicos se debe a que éstos se utilizan como sustratos para la depuración y la formación final de nuevas estructuras para la respiración y la formación final de nuevas estructuras químicas a base de carbón; también puede ocurrir una dilución a medida que el fruto crece. Una reducción en ácidos orgánicos no significa necesariamente un aumento en el PH (Díaz, 2002).

Cuadro 9. Parámetros fisicoquímicos de frutos de *Rubus spp.* Letras diferentes denotan las diferencias significativas (Tukey; $p < 0.05$)

Especies	Peso (g)	SST (°Brix)	Acidez titulable	PH	N° drupas
<i>R. adenotrichus</i>	3.30 b	10.00 b	1.16 a	3.44 a	81.00 a
<i>R. coriifolius</i>	3.44 b	13.16 a	0.55 c d	3.38 a	20.66 c
<i>R. humistratus</i>	2.20 c d	9.00 d	1.19 a	3.14 c d	59.33 b
<i>R. sapidus</i>	3.23 b c	10.00 b	0.80 b c	3.44 a	69.33 a b
<i>R. cymosus</i>	1.60 b c	9.33 c	0.96 b	3.24 b c	53.66 b
<i>Tupy</i>	7.40 a	9.81 b	1.10 a	3.33 a b	86.00 a

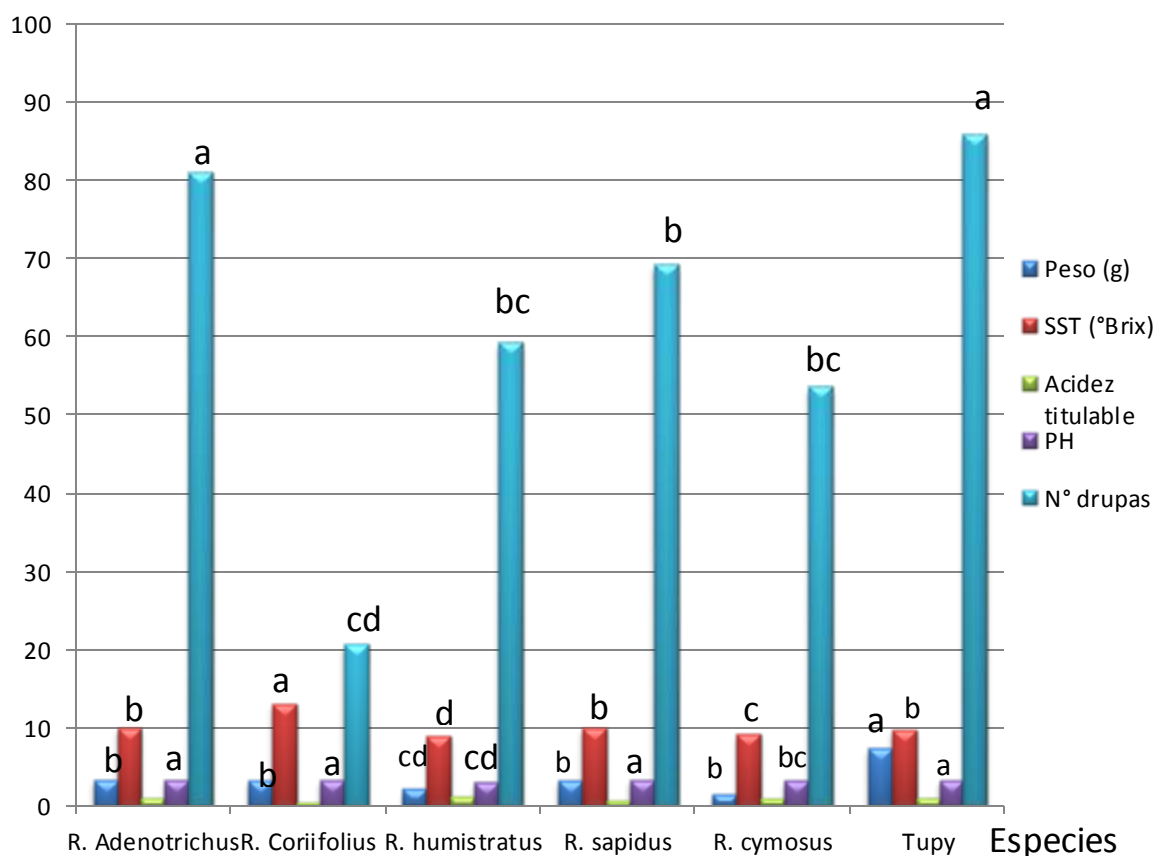


Figura 33. Parámetros fisicoquímicos de *Rubus spp.* Diferencias significativas (Tukey; $p < 0.05$)

Niveles de ploidía

Se presentaron diferencias significativas entre los niveles de ploidía de diploides a tetraploides $2x = 14$, $3x = 21$ y $4x = 32$ en las especies de *Rubus adenotrichus*, *R. humistratus*, *R. coriifolius*, *R. cymosus* y *R. sapidus*. La poliploidía juega un papel muy importante en la evolución del género *Rubus* (Thompson, 1997).

Las especies, *R. adenotrichus*, *R. humistratus* y *R. coriifolius* fueron diploides ($2n = 14$), (Figura 34). En el caso de *R. adenotrichus*, se confirmó el número cromosómico diploide - reportados por Thompson (1995).

La especie *R. cymosus* presento 21 cromosomas, es decir, es triploide. De acuerdo con Ramsey y Schemske (1998), las especies triploides presentan baja fertilidad y tienden a producir gametos aneuploides, por los emparejamientos cromosómicos y la segregación durante el proceso de la meiosis, que dan origen a gametos euploides. Las plantas diploides pueden producir descendencias triploides y tetraploides; como consecuencia, los triploides pueden facilitar la transición de diploides a tetraploides, permitiendo la propagación de poliploides.

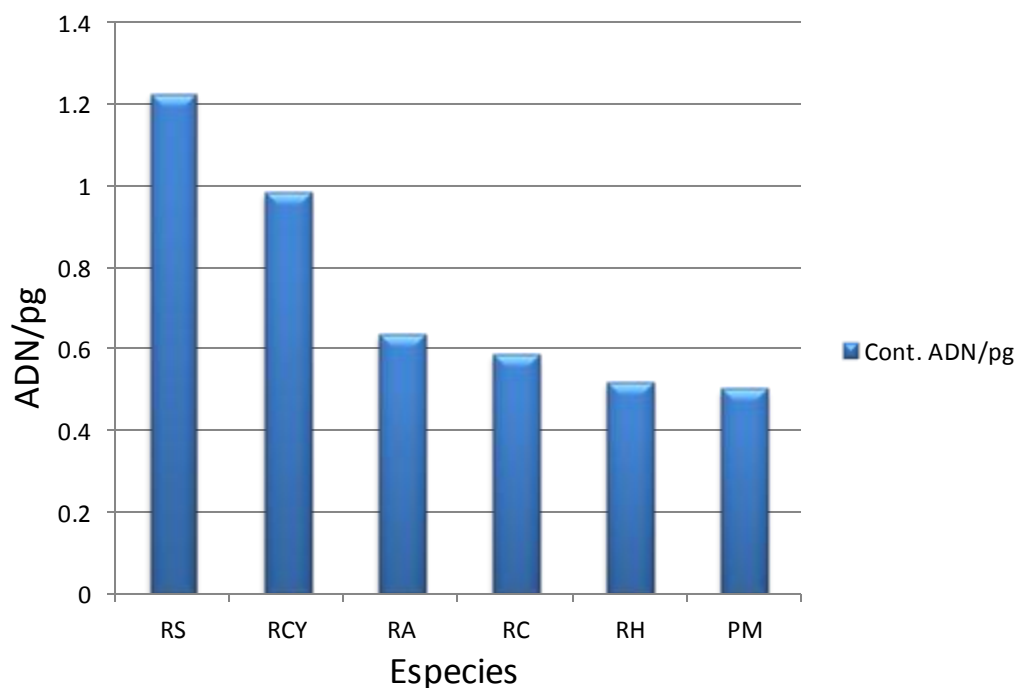


Figura 32. Contenido de ADN/pg en las especies de *Rubus* spp. Diferencias significativas (Tukey; $p < 0.05$)

Rubus sapidus mostró ser tetraploide ($2n= 4x= 28$) (Figura 1). Las especies poliploides generalmente marcan diferencias de sus progenitores en las características morfológicas, ecológicas, fisiológicas y citológica, que pueden contribuir en el conocimiento de nuevos nichos ecológicos y reproductivos (Levin, 2002). Por lo tanto, la poliploidía es un mecanismo importante de adaptación y especiación en las plantas (Otto y Whitton, 2000).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por (Meng, 2002) donde presentaron especies de *Rubus* 2x, 4x, 6x, 8x, 9x.

Las plantas poliploides presentan mayor avance en relación a la evolución en comparación con sus ancestros diploides (Fawcett *et al*, 2009; Proost *et al.*, 2011). Las especies poliploides generalmente marcan diferencias de sus progenitores en las características morfológicas, ecológicas, fisiológicas y citológicas, que pueden contribuir en el conocimiento de nuevos nichos ecológicos y reproductivos (Levin, 2002). Por lo tanto, la poliploidía es un mecanismo importante de adaptación y especiación en las plantas (Levin, 2002; Otto y Whitton, 2000).

El contenido promedio de ADN para las cinco especies analizadas por citometría de flujo osciló entre 0.72 y 1.89 pg.

Para establecer el nivel de ploidía a partir de los histogramas, se identificaron especies diploides, triploides y tetraploides (Figura 35). Estos resultados fueron determinados a partir de la relación entre el contenido de ADN del control y de cada muestra. El control (*Prunus mahaleb*) con un valor promedio de 0.50 pg, la especie de *R. sapidus* se ubica dos veces más lejos de éste por lo cual, se considera tetraploides. *R. coriifolius*, *R. humistratus* y *R. adenotrichus* presentaron valores cercanos al control, es decir, diploides. *R. cymosus* se presentó triploide.

Las especies diploides *R. adenotrichus*, *R. coriifolius* y *R. humistratus* tenían el contenido de ADN más bajo, con una media de 0.77, 0.74 y 0.72 pg, respectivamente, *R. cymosus* triploide con una media de 1.26 pg y *R. sapidus* tetraploide con una media de 1.89 pg.

Parte de la variación en el contenido de ADN nuclear podría resultar de reiterar secuencias altamente (redundantes) de ADN en el genoma. El estrés ambiental y genómico podría haberse activado la amplificación y la supresión de secuencias de ADN (Bennett y Leitch, 1995).

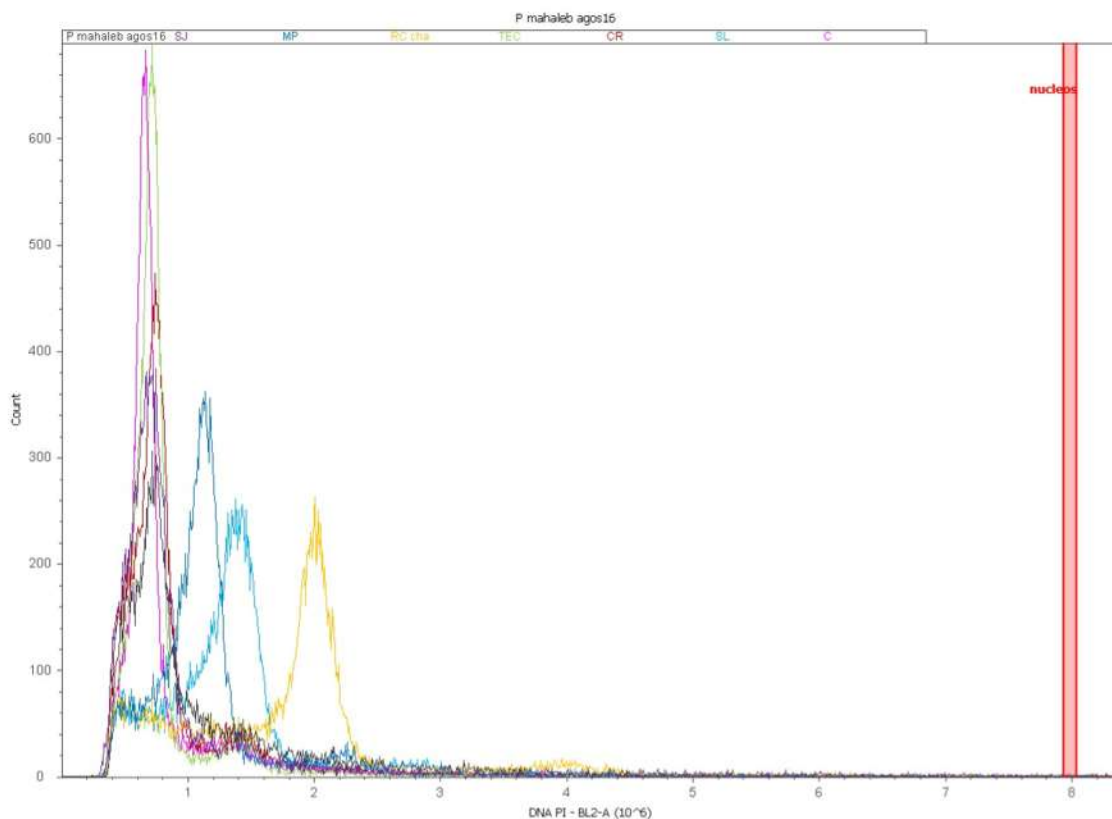


Figura 33. Histograma de las especies evaluadas, relativo a la intensidad fluorescente a) control *prunus mahaleb* pico negro, b) *R. humistratus* pico verde, c) *R. adenotrichus* pico purpura, d) *R. coriifolius* pico morado, e) *R. cymosus* pico azul fuerte, f) *R. sapidus* pico azul cielo.

Correlación de las variables

El análisis de correlación de las variables cuantitativas ha indicado importantes diferencias estadísticas entre las distintas variables, los cuales se discuten a continuación en la Figura 36. El contenido de polifenoles (POLI) se ve influenciado por el tamaño del peciolo (PTA) con un valor de $r^2=0.88$, presentando una alta

correlación, el peso del fruto (PS) presentan alta correlación con el número de drupas (NM)) mostrando el valor de $r^2= 0.92$, el peso del fruto (PS) está correlacionado con la longitud de la rama latente (RLL) y con la postura del foliolo superior (FSP) valores de $r^2=0.84$ y 0.93 .

El crecimiento diferenciado entre variedades mejoradas y materiales silvestres obedece a que, dentro de una variedad siempre, se busca obtener altos rendimientos a través del mejoramiento genético (Agusti, 2004; Way *et al.*, 1983). Entre las características más importantes que interesan del fruto de zarzamora están: su tamaño, firmeza, sabor y tamaño de las semillas (Moore y Skirvin, 1990). El pH está relacionado con el número de ramas (RLR) y el tamaño de la espina (ETA). Por otro lado, el número de ramas (RLR) está altamente correlacionado con el diámetro de la rama latente (RLD), presentando un valor de P de 0.014 y el valor de R^2 0.90. La longitud de la rama latente (RLL) presenta una relación recíproca con la profundidad de las incisiones del foliolo (FSP). La longitud del foliolo (FSL) está correlacionado con el ancho del fruto (TAN). Se debe destacar que la forma del fruto está relacionada con las características morfológicas de la planta. La profundidad del foliolo (FSP) está relacionada con el diámetro de la flor (FLD); la longitud del fruto (FLO) está altamente correlacionada con el número de drupas (TND), presentando un valor de P de 0.013 y el valor de R^2 0.90; a medida que los frutos son más alargados, el número de drupeolas también aumenta. La cantidad y la posición de las semillas en el fruto influyen en el tamaño y la forma final del mismo (Díaz, 2002), ya que estas son fuente de citosinas, giberelinas y auxinas, que son secretadas al tejido del ovario inducen una mayor división y expansión celular (Salisbury y Ross, 1994).

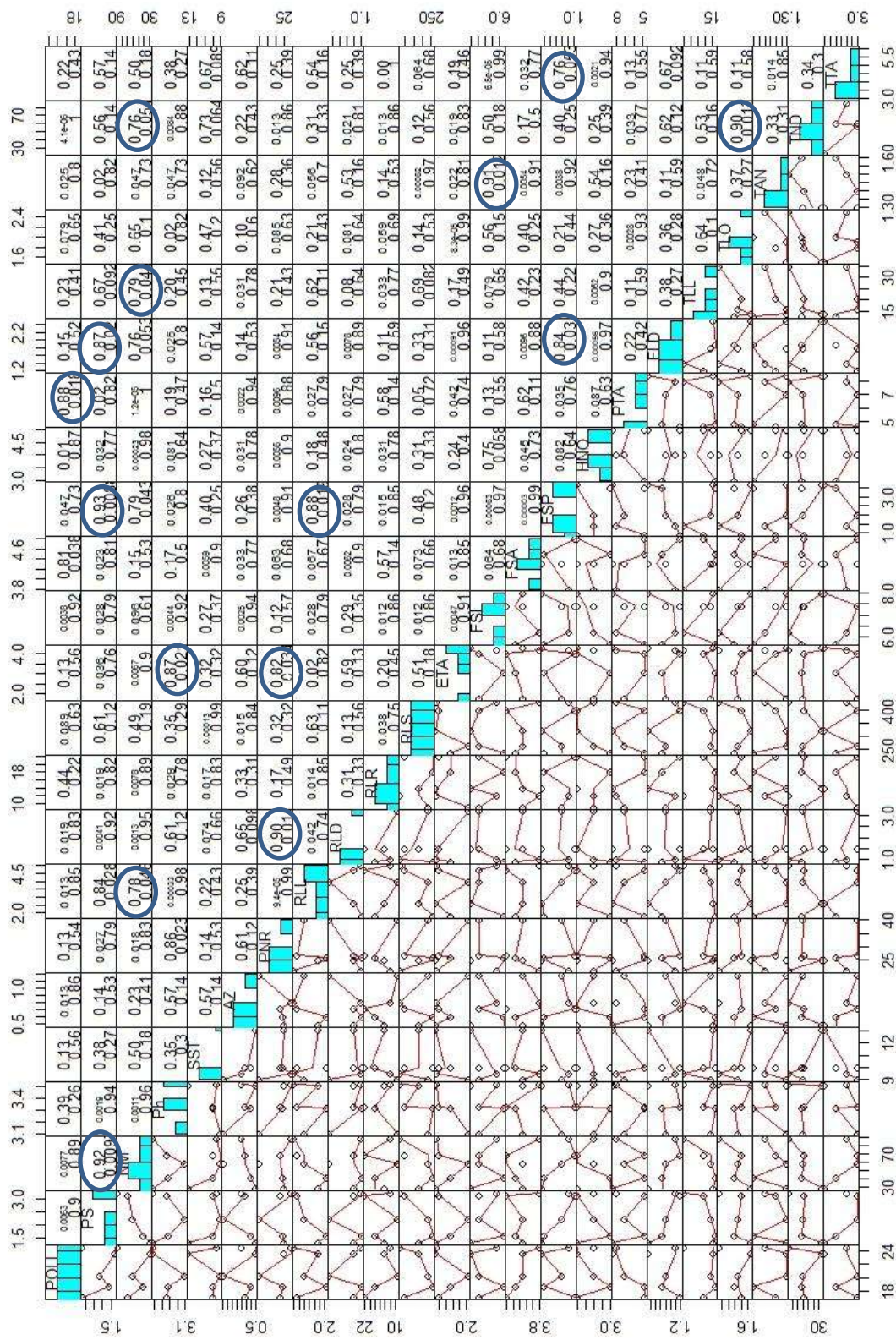


Figura 36. Correlaciones de las variables cuantitativas evaluadas $r > 0.60$ y $p < 0.05$ valor de r números grandes y valor de p número pequeño.

V. CONCLUSIONES

Para la descripción morfológica de las especies de *Rubus* no existe un descriptor IPGRI (Instituto internacional de Recursos Fitogenéticos). Por esta razón, en el presente trabajo se utilizaron los descriptores de la UPOV. Se proponen una lista de 32 descriptores que resultaron los más discriminantes para la elaboración de un descriptor para especies de *Rubus*; estos descriptores son: rama latente: distribución predominante de las ramas (RLP), época de comienzo de la madurez del fruto (NFR), fruto: relación longitud/anchura (TRE), flor: diámetro (FLD), foliolo superior: longitud (FSL), fruto: tamaño de la drupa (TTA), brote joven: intensidad del color verde (BJI), brote joven: pigmentación antocianica (BJP), rama latente: longitud (RLL), fruto: color (TCO), foliolo superior: ondulado del borde (FSO), fructificación lateral: longitud (TLL), época de la brotación de la yema foliar (NEP), fruto: color (TCO), flor: color del pétalo (FLC), brote joven: densidad de la rama pilosidad glandular (BJD), rama latente: espinas (RLD), foliolo profundidad de las incisiones (FSP), época de comienzo de la floración en la rama del año anterior (ECF), número de ramas nuevas (PNR), porte de la planta (PPO), rama latente: número de espinas (RLS), espina: tamaño (ETA), foliolo superior: anchura (FSA), peciolo: tamaño de las estipulas (PTA), fruto: longitud (TLO), foliolo profundidad de las incisiones (FSP), fruto: número de drupas (TND), Rama latente: pigmentación antocianina (RLA), rama latente sección trasversal (RLT), foliolo superior: longitud (FSI) y hoja numero de foliolos(HIN).

Las cinco especies de *Rubus* descritas forman grupos definidos, *R. adenotrichus*, *R. sapidus* y *R. humistratus*, tienen un patrón de variabilidad morfológica relacionados, que hace pensar en grupos no distantes o posible complejo genético, mientras que *R. cymosus* y *R. coriifolius* forman grupos muy distantes. Los caracteres de *R. coriifolius* mostraron mayores diferencias que las otras cuatro especies.

Los frutos de los materiales silvestres de *Rubus* colectados en el estado de Michoacan contienen niveles altos de polifenoles; *R. adenotrichus* es la especie que más destaca en este aspecto.

Los frutos que producen las plantas del genero *Rubus* son fuente de metabolitos con capacidad antioxidante. Por lo tanto, este estudio contribuye al conocimiento científico de los frutos silvestres de nuestro país al obtener información del contenido de metabolitos, lo cual es de transcendencia en el área alimenticia y de la salud.

Las especies de zarzamoras presentaron variabilidad en el número de juegos cromosómicos: *Rubus adenotrichus*: $2n = 2x = 14$; *R. cymosus*: $2n = 3x = 21$; *R. humistratus*: $2n = 2x = 14$; *R. coriifolius*: $2n = 2x = 14$; *R. sapidus*: $2n = 4x = 28$. La citometría de flujo ofrece la oportunidad de determinar rápidamente el tamaño del genoma de genero *Rubus*, que es un parámetro importante para muchos aspectos de estudios a nivel molecular

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alice, L. A. and C. S. Campbell. 1999. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany* 86: 81-97.
- A.O.A.C. 2000. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemist. 17a edición. Cap.37, 42, 44 y 45
- Agusti, 2004. Fruticultura. Ediciones Mundi-Prensa. España. 493 p.
- Amakura, Y., Y. Umino, S. Tsuji, and Y. Tonagai. 2000. Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6292-6297.
- Arumuganathan, K. and E.D. Earle. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Rpt.* 9:229-241.
- Bramardi, S.J. 2002. Analisis multivariado. Su aplicación en la caracterización de recursos genéticos. Facultad de ciencias Agrarias, Univ. Conahue, Estación Exp. INTA, Argentina. 60 p.
- Bennett M. Leitch I. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann Bot* 76:113e76.
- Bennett, M. D. and I. J. Leitch. 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany* 107: 467-590.
- Bennett M. D., P. Bhandol y I. J. Leitch (2000) Nuclear DNA Amounts in angiosperms and their modern uses 807 new estimates. *Annals of Botany* 86:859-909.
- Boluda CJ, Duque B y Aragón Z (2005). Lignanos (I): estructura y function en las plantas. *Revista de Fitoterapia* 5(1): 55-68.

- Borys, M. W. y H. LeszzyAska. 2001. El potencial frutícola de la República Mexicana. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, Toluca, Edo. de México. México. 99 p.
- Botero, N. 1995. Efecto de la abeja melífera sobre la producción de mora castilla. Trabajo de investigación sobre abeja africanizada. Comité Sectorial de Antioquia. 195 p.
- Bramardi, S. J. 2002. Analisis multivariado: su aplicación en la caracterización de recourses genéticos. Facultad de ciencias Agrarias, Univ. Conahue, Estación Exp. INTA, Argentina. 60 p.
- Cancino-Escalante, G. O., D. S. Barbosa-Ernández y C. Díaz-Carvajal. 2012. Diversidad genética de especies silvestres de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiente de Colombia. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 10: 80-89.
- Carretero AME (2000). Compuestos fenólicos: shikimatos (II). Panorama Actul del Medicamento 24 (233): 432-435
- Chaves, M.M., J. Osorio, and J.S. Pereira. 2004. Water use efficiency and photosynthesis. pp. 42-74. In: M. A. Bacon (ed.). Water use efficiency in plant biology. Blackwell Publishing, Inc. London, UK.
- Chargoy Z., C. I. 2004. La medición agronomica de la eficiencia en el rendimiento de los cultivos multiples. pp 110-107. En: J. L. Chávez-Servia, J. Tuxill y D. I. Jarvis (eds.). Manejo de la diversidad de los cultivos en los Agroecosistemas Tradicionales. Instituto internacional de Recursos Fitogénéticos. Cali, Colombia. 264 p.
- Clark *et al.*, 2007. Blackberry breeding and genetics. pp. 19-146. In: J. Janick (ed.). Plant Breeding Reviews. Vol. 29. John Wiley & Sons, Inc. 56 p.

- Cretti, L. 1986. Bayas y frutos silvestres. Dorki (trad). Daimon Barcelona, España. p 120
- Coronado G., M. A, M. García P., V. G. Santiago H., A. Córdova Y. y R. A. Vásquez N. 2014. La zarzamora, un mercado potencial para los productores agropecuarios de la Sierra de Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios* 18 (34): 784-794.
- Cuevas-Rodríguez, E.O., G.D. Yousef, P.A. García-Saucedo, J. López-Medina, O. Paredes-López, and M.A. Lila. 2010. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidinas in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 58(12): 7458-7464.
- Cruz J, R. 1997. Los citunes silvestres (*Rubus* spp.), su caracterización taxonómica y ecológica en una región del sur de la meseta Pùrhepecha. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 60 pp.
- Dai, J.; Patel, J. D.; Mumper, R. J. 2007. Characterization of blackberry extract. And antiproliferative and anti-inflammatory properties *J. Med. Food.* 10, 258-265
- Delgado-Lina M., A. Uribe-Lastra y M. L. Marulanda-Ángel. 2010. Estandarización de la técnica citogenética "Squash" para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica* 46: 74-79.
- Dell'Agli M, Buscialá A y Bosisio E (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research.* 63: 593-602.
- Diaz M., D. H. 2002. Fisiología de Árboles Frutales. AGT Editor. México. 389 p.
- Dillon, W. R. and M. Goldsten. ; 1984. Multivariate analysis: Methods and applications. Willey, Nueva York. 587 p.
- Dolezel, J. 1997. Aplicaciones de flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38: 285-302

- Enríquez G. (1991) Descripción y evaluación de los recursos genéticos. *En: Técnicas Para el Manejo y Uso de los Recursos Genéticos Vegetales*. R. Castillo, J. Estrella y C. Tapia (eds). Editorial Porvenir. Quito Ecuador. pp: 116-160.
- Estupiñan, D. C, S. J. Schwartz, and G. A. Garzón. 2011. Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with andres Berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin power. *Journal of Food Science* , 76: 26-34
- Fawcett, J. A., S. Maere and Y. Van de Peer. 2009. Plants with doublée genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 106: 5737-5742.
- Finn, C. 2008. *Rubus* spp., blackberry. pp. 348-351. In: J. Janick and R. E. Paull (eds.). *The encyclopedia of fruits and nuts*. Cabi Publishing, Cambridge, MA. 800 p.
- Fauconnea B, Wrolstad RE (2006). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*. 70(3):C198.C202
- Focke, W. O. 1914. *Synopsis Rubrum Germaine*. Campaña Editorial Continental. México. 25 p.
- Galbraith, D. V., K. R. Harkins, J. M. Mardox, N. M. Ayres, D. P. Sharma and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. *Science* 220: 1049-1051.
- Galletta, G. J., J. R. Ballington and A. D. Draper. 1989. Pregermination treatment of seeds of species and hybrids in *Rubus* with sodium hypochlorite. *Acta Horticulture* 262: 289 B295

- Galleta, G.; C. Violette 1989. The Brambles. pp: 3-8. In: Brambles Production Guide. M Pritts, D Handley (eds). Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Ithaca, New York, E.U.
- González-Andrés F. (2001) Caracterización morfológica: In: Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos. F. González-Andrés y J. Pita-Villamil (eds). Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid, España. pp:199-217.
- Graham, J. and M. Woodhead. 2009. Raspberries and blackberries: The genomics of *Rubus*. pp. 507-524. In: K. Folta and S. Gardiner (eds.). Genetics and genomics of Rosaceae. Springer. New York, USA. 636 p.
- Hair Jr., J. F., R. E. Anderson, R. L. Tatham, and W. C. Black. 1992. Multivariate data analysis. MacMillan Publ. Co. Nueva York. 544p.
- Harling, G. and Anderson, L. 1996. *Rubus* L. In: Flora del Ecuador 56: 5-6.
- Helrich, K. 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14th Ed. Washington, D.C. 708 p.
- Heslop-Harrison, J. S. and T. Schwarzacher. 2011. Organization of the plant genome in chromosomes. *Plant Journal* 66: 18-34.
- Heller, F. O. 1993. DNA measurement of vicia faba L with the pulse cytophotometry. Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft 86: 437-441
- Hijmans, R.J, L. Guarino, C. Bussink, P. Mathur, M. Cruz, I. Barrantes y E. Rojas. 2004. DIVA-GIS Versión 4. Sistema de información geográfica para el análisis de datos de distribución de especies. Guía de usuario. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 83 p.
- Hidalgo R. (2003) Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos

- Fitogenéticos. T. L. Franco y R. Hidalgo (eds). Boletín Técnico No. 8. IPGRI, Cali, Colombia. pp: 2-26
- Iriondo, A. J. M. 2001. Conservación de recursos filogenéticos. pp. 15-35. Conservación y caracterización de Recursos Fitogenéticos. En: González-Andrés F. y J. M. Pita Villamil (eds). Publicación INEA Mundi-Prensa. Valladolid, España. 40:852-855. P 15-31
- Isaza MJH (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* 13(033):13-18
- Juinn-Yíh, H. and H. Jer-Ming. 2009. Revision of *Rubus* (Rosaceae) in Taiwan. *Taiwania International Journal of Life Sciences* 54: 285-310.
- Kahlon, T. S. Smith, G. E. 2007. *In vitro* binding of bile acids by blueberries (*Vaccinum spp*), plums (*Prunus spp.*), prunes (*Prunus spp.*), strawberries (*Fragaria X ananassa*), cherries (*Malpighia puniceifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*). *Food chem.* 100, 1182-1187.
- Koes, R. E., F. Quattrocchio and J. N. M. Mol. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16: 123-132.
- Levis, D. A. 2002. The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press. 231 p.
- Lim, K. Y., I. J. Leitch and A. R. Leitch. 1998. Genomic characterization and the detection of raspberry chromatin in polyploidy *Rubus*. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1027-1033.
- López J. A. y Hidalgo, M.D. 1994. Análisis de componentes principales y análisis factorial. En: Ato, M López, J.J. (eds). Fundamentos de estadística con Systat. Addison Wesley Iberoamericana.p.457-503

- Lopez-Medina, J. 2009. Production forzada de frutillas en Mexico. II Symposium Nacional de Production Forzada de Frutillas. Programa de Fruticultura. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. Mexico. p 15-20.
- Marulanda, M. L., A. M. López and S. B. 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.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., and Billot, J. 1990. Fruit phenolics. CRC Pres. Boca Raton. FL. USA. Pp 67-75.
- Marcano, J. 2007. Las flores en ls plantas.(on line). Perú. Fecha de consulta: Diciembre 3 de 2015. <http://www.jmarcano.com/bosques/via/plantas/flores.html>
- Martínez, M. A. 2005. Quinonas y compuestos relacionados. Universidad de Antioquia. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/ff/quinonas.pdf>. (consultado el 16 diciembre de 2016)
- Martínez-Valverde, I., M. J. Periago y G. Ros. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenolicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50: 5-18.
- Masterson, J 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421-423.
- Meng, R. and C. E. Finn. 2002. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by cytometry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 767-775.
- Mercier, R., C. Mezard, E. Jenczewski, N. Macaisne and M. Grelon. 2015. The molecular biology of Meiosis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 66: 297-327.

- Monasterio-Huelin, M. 1992. Revisión taxonómica del género *Rubus* L (Rosaceae) en la península ibérica e Islas Baleares. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 217 p.
- Monasterio H. y E. Macía (2002) Revisión taxonómica del género *Rubus* L. (Rosaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. 217 p.
- Moore, J. N. and R. M. Skirvin. 1990. Blackberry management. pp. 27-29. *In*: G. J. Galleta and D. G. Himelrick (eds.). Small Frut Crop Management. Prentice Hall. New, Jersey. USA. 608 p.
- Mora Macías, J. 2009. Establecimiento de las bases para la identificación molecular de materiales silvestres del género *Rubus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 89 p.
- Moreno M., D. Villarreal, T. C. Lagos, H. Ordoñez y H. Criollo (2011) Caracterización "*In situ*" de genotipos silvestres y cultivadas de mora *Rubus* spp en el municipio de Pasto. *Revista de ciencias agrícolas* XXVII: 109-128.
- Murcia, M. A., M. Martínez-Tomé, A. M. Jiménez, A. M. Vera, M. Honrubia and P. Parras. 2002. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *Journal of Food Production* 65: 1614-1622.
- Nathewet, P., T. Yanagi, Y. Iwastubo, K. Sone, T. Takamura and N. Okuda. 2009. Improvement of staining method for observation of mitotic chromosomes in octoploid strawberry plants. *Scientia Horticulturae* 120: 431-435.
- Ourecky, D. K. 1975. Brambles. pp. 98-129. *In*: J. Janick and J. N. Moore (eds.). *Advances y Fruit Breeding*. Purdue University Press. West Lafayette, Indiana. 623 p.

- Otto, S. P. and J. Whitton. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Reviews of Genetics* 34: 401-437.
- Palomino J. M. y D. Allen. 2005. Citotipos en *Agave angustifolia* Haw determinados por citometria de flujo y análisis en sus cariotipos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 1: 49-54.
- Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA y Diamantidis Gr 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascórbico acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry* 102: 777-783.
- Potter, D., T. Eriksson, R. C. Evans, S. Oh, J. E. E. Smedmark, D. R. Morgan, M. Kerr, K. R. Robertson, M. Arsenault, T. A. Dickinson and C. S. Campbell. 2007 Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 266: 5-43.
- Prior, R. L., X. Wu and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Proost, S., P. Pattyn, T. Gerats and Y. Van Der Peer. 2011. Journey through the past: 150 million years of plant genome evolution. *Plant Journal* 66: 58-65.
- Ramsey J. and D. W. Schemske. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467-501.
- Rebollar-Alviter, A., H. V. Silva-Rojas, L. X. Zelaya-Molina, and M. A. Ellis. 2009. First report of *Peronospora sparsa* causing downy mildew (Dryberry) of *Rubus fruticosus* in Mexico. *Plant Diseases* 93: 674.

- Reyes, C. J. 2010. Variedades silvestres de zarzamora presentan un mayor actividad antioicante que las cultivadas. Boletín de SOMEFI. [Http://www.somefi.org/boletin.htm](http://www.somefi.org/boletin.htm).
- Reyes-Carmona, J., G. G. Yousef, R. A. Martínez-Peniche, an M. A. Lila. 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science* 70: 493-503
- Rieseberg, L. H. and J. H. Willis. 2007. Plant speciation. *Science* 317: 910-914.
- Rieseberg L. H. and J. H. Willis (2007) Plant speciation. *Science* 5840:910-914.
- Rieseberg, L. H. and J. H. Willis. 2007. *Science* 317: 910-914.
- Romoleroux, K. 1992. Rosaceae in the paramus of Ecuador. Academic Press Limited. 109 p.
- Romoleroux, K. 1996. Flora of Ecuador. 1st. ed. Department of Systematic Botany, University of Goteborg. Estocolmo (Noruega). 169 p.
- Rzedowsky, J. y G. Calderón de Rzedowski. 2005. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 135 Rosácea. INE Pátzcuaro. 163 p.
- SAS (Statistical Analysis System). 2000. SAS Institute Inc., Cary, NC. 1032 p.
- SAS/STAT. 2008. The REG Procedure. Chapter 34; SAS Institute Inc. 2008. 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 5428-5434.
- Salmeron, S. B. A. 2010. Evaluación de compuestos polifenolicos y potencial antioicante de frutos de zarzamora silvestre (*Rubus* spp.) colectados en Michoacan. 88 p.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. Fisiologia Vegetal. Grupo Editorial Iberoamerica S. A. México. 759 p.

- Seeram, N.P. Lee, R. Scheuller, H. S. y Heber, D. 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem.* 97, 1-11.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Disponible en www.sagarpa.gob.mx. Consultado el 20 de Diciembre de 2015.
- Segura, S., A. Rebollar-Alviter, J. Boyzo-Marín, M. Hernández-Bello, and J. López-Medina. 2012. Genetic resources of blackberry wild species in Michoacan, Mexico. *Acta Horticulturae* 946: 107-111.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventón. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Soltis, D. E. and J. G. Burleigh. 2009. Surviving the K-T mass extinction: new perspectives of polyploidization in angiosperms. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5456-5456.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. Plant physiology. 4th. edition. Sunderland: Sinauer Associates - San Diego, CA. 690 p.
- Tomás-Barberán, F. A. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud* 10: 41-53.
- Thompson, M. M. 1995. Chromosome numbers of *Rubus* cultivars at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience* 30: 1453-1456.
- Thompson, M. M. 1997. Survey of chromosome number in *Rubus* (Rosaceae: *Rosoideae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 129-165.
- Vivanco, J. M., E. Cosío, V. M. Loyola-Vargas y H. E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigacion y Ciencia* 341 : 68-75.

- UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). 2006. Zarzamora. Código UPOV: RUBUS_EUB RUBUS_IEU (*Rubus* subgénero *Eubatus*). Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg022.pdf (Fecha de acceso: 18/10/2013).
- Xiuzhen, H., S. Tao and L. Hongxiang. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8: 950-988.
- Wang SY y Lin HS 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2): 140-146
- Way, R. D., J. C. Sanford and A. N. Lakso. 1983. Fruitfulness and productivity. pp. 353-367. *In*: J. N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana. 464 p.
- Weber, H. E. 1996. Former and modern taxonomy treatment of the apomictic *Rubus* complex. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 31: 373-380.
- Zamorano M., A. C. Morillo C., Y. Morillo C., H. Vásquez A. and J. E. F. Muñoz (2007) Caracterización morfológica de mora en los departamentos del Valle del Cauca, Cauca y Nariño, de Colombia. *Acta Agronómica* 56:51-60.