



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudio filogenético de las especies del género *Rubus* L. (Rosaceae) de Ecuador inferido a partir de ADN nuclear y cloroplástico**

**Disertación previa a la obtención del título de  
Licenciado en Ciencias Biológicas**

**DAVID ANDRÉS ESPINEL ORTIZ**

**Quito, 2019**

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. David Andrés Espinel Ortiz ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, podría ser presentada para la calificación correspondiente.

*Katya Romoleroux*

---

Katya Romoleroux, Ph.D.

Directora de la Disertación

Quito, 24 de abril de 2019

*A mi familia y amigos,  
Por demostrarme que estar en la oscuridad,  
solo significa que aún no has visto la luz.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera cordial a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por haber financiado este proyecto.

Agradezco de sobremanera a Katya Romoleroux, por haberme dado una oportunidad en el laboratorio de Botánica Sistemática y demostrarme que las plantas guardan su belleza, por los conocimientos que compartió conmigo durante los últimos 5 años, por involucrarme en el mundo de la ciencia, por su paciencia y amistad.

A Verónica Crespo y Myrian Rivera, por haberme permitido asistirles en sus cátedras en la carrera de Biología y demostrarme que el mundo de la ciencia es muy gratificante. A Santiago Ron y Kevin Burgess por la asistencia y consejo durante el análisis de los resultados. A Claudia Terán y el Laboratorio Molecular de Herpetología, por el uso de equipos y consejos durante la fase de laboratorio. A Priscilla Muriel, María Eugenia Ordóñez y Katya Romoleroux por sus correcciones y valiosas sugerencias en este escrito.

Al equipo del laboratorio de Botánica Sistemática por su ayuda en distintas etapas de esta investigación.

A mis amigos de la universidad, principalmente a Esteban Bastidas, Antonella Bernardi, Erika Caicedo, Gonzalo Domínguez, Andrés Gortaire, Ignacio Pacheco, Camilo Restrepo, Carla Rodríguez, Andrés Sanguano, Oswaldo Tejada y Daniel Utreras por los momentos gratos dentro y fuera de las aulas de clases y su ayuda durante mi vida universitaria; y a Daniela Poveda, mi amiga del colegio por siempre estar disponible cuando la necesitaba.

A mis padres, mis hermanos y mi familia por creer siempre en que podría lograrlo y por ayudarme a forjar mi carácter.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1. IMPORTANCIA MUNDIAL DEL GÉNERO <i>RUBUS</i> L.....	4
3.2. TAXONOMÍA DE <i>RUBUS</i> L.....	5
3.3. DIVERSIDAD DE <i>RUBUS</i> EN ECUADOR .....	7
3.4. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS .....	7
3.5. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	8
3.6. OBJETIVOS.....	9
3.6.1. OBJETIVO GENERAL .....	9
3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
4.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	10
4.2. EXTRACCIÓN DE ADN .....	10
4.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN.....	11
4.3.1. SELECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES .....	11
4.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	12
4.4. SECUENCIAMIENTO AUTOMÁTICO .....	12
4.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	13
4.5.1. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS .....	13
4.5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	13
5. RESULTADOS.....	16
5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	16
5.2. ANÁLISIS MOLECULAR .....	16
5.3. ANÁLISIS MUNDIAL DE <i>RUBUS</i> .....	16
5.3.1. REGIÓN ITS.....	22
5.3.2. REGIÓN TRNL-TRNF .....	25
5.4. ANÁLISIS DE <i>RUBUS</i> DE ECUADOR .....	27
5.4.1. REGIÓN ITS.....	27
5.4.2. INTERPRETACIÓN DE LOS ÁRBOLES NUCLEARES .....	28

5.4.3. REGIÓN TRNL-TRNF .....	28
5.4.4. REGIÓN TRNS-TRNG.....	30
5.4.5. INTRÓN TRNG.....	30
5.4.6. INTERPRETACIÓN DE LOS ÁRBOLES CLOROPLÁSTICOS.....	31
6. DISCUSIÓN.....	34
6.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS ESPECIES DE <i>RUBUS</i> DEL MUNDO .....	34
6.2. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS ESPECIES ECUATORIANAS DE <i>RUBUS</i> .....	36
6.2.1. TRABAJO MOLECULAR.....	36
6.2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	36
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	40
8. REFERENCIAS.....	41
9. ANEXOS .....	48

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Representantes del subgénero <i>Orobatus</i> .....	17
Figura 2. Representantes del subgénero <i>Rubus</i> .....	18
Figura 3. Representantes del subgénero <i>Idaeobatus</i> ..	19; <b>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</b>

<b>Figura 4. Filogenia mundial de <i>Rubus</i> deducida a partir de la región ITS .....</b>	<b>24</b>
Figura 5. Filogenia mundial de <i>Rubus</i> deducida a partir de la región trnL-trnF .....	26
Figura 6. Filogenia de <i>Rubus</i> de Ecuador deducida a partir de la región ITS .....	29
Figura 7. Filogenia de <i>Rubus</i> de Ecuador deducida a partir ADN cloroplástico .....	32

**LISTA DE TABLAS**

más adelante	Tabla 1. Lista de especímenes recolectados .....	20
	Tabla 2. Especímenes utilizados en el estudio filogenético .....	22
	Tabla 3. Características de las secuencias de ADN .....	27
	Tabla 4. Posibles eventos de hibridación .....	38

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Clasificación infragenérica de las especies de <i>Rubus</i> de Ecuador en base a la clasificación taxonómica de Focke (1910, 1911, 1914) y Romoleroux (1996) .....	48
Anexo 2. Regiones de ADN utilizadas para el análisis filogenético .....	49
Anexo 3. Información de las secuencias extraídas del GenBank .....	50

## 1. RESUMEN

El género *Rubus* L. se considera como uno de los taxa más complejos de la familia Rosaceae; eventos paralelos de hibridación y evolución reticulada dificultan su clasificación taxonómica. En total, se reconocen 14 subgéneros de los cuales tres, *Rubus*, *Orobatus* e *Idaeobatus*, están presentes en Ecuador con 21 especies. Con el fin de corroborar las relaciones filogenéticas de las especies ecuatorianas de *Rubus* se construyeron árboles filogenéticos a partir de la región ITS del ADN nuclear (nrDNA) y las regiones trnL-trnF, trnS-trnG y el intrón trnG del ADN cloroplástico (cpDNA). Adicionalmente, a partir de GenBank se obtuvo la secuencia de las regiones ITS y trnL-trnF de distintas especies y subgéneros de *Rubus* y de *Rosa multiflora*, *Fragaria chiloensis* y *Potentilla argentea* (grupos externos) para evaluar la ubicación de las especies ecuatorianas respecto al resto de los subgéneros de *Rubus* a nivel mundial. Se realizó el análisis filogenético de 26 muestras de 15 especies de *Rubus* presentes en Ecuador siendo esta la primera ocasión en la que se incluye información molecular del subgénero *Orobatus* y de varias especies sudamericanas del subgénero *Rubus*. Todos los análisis filogenéticos mostraron al género *Rubus* como un grupo monofilético. En los análisis mundiales, se observó una tendencia de las especies ecuatorianas a formar un grupo aislado del resto de especies del mundo. Los subgéneros *Malachobatus* e *Idaeobatus* fueron representados como grupos parafiléticos y polifiléticos, respectivamente, mientras el resto no presentó una resolución clara. En los análisis nacionales, se apreció una monofilia parcial de *Rubus* y *Orobatus* (nrDNA) y una total de *Idaeobatus*, corroborando, parcialmente, la clasificación morfológica de las especies ecuatorianas con evidencia molecular. A nivel general no existió muy buena resolución filogenética interespecífica y se observaron incongruencias entre los árboles nucleares y cloroplásticos, probablemente, debido al origen híbrido de varias especies de este género. Finalmente, *Rubus* es un género monofilético cuyas especies presentan una historia evolutiva compleja lo cual dificulta cualquier estudio filogenético. La implementación de un mayor número de regiones de ADN y otros estudios en distintas disciplinas son necesarios para lograr entender de mejor manera la taxonomía e historia evolutiva de este género.

**Palabras clave:** cpDNA, evolución reticulada, filogenia, hibridación, ITS, nrDNA, Rosaceae, *Rubus*.

## 2. ABSTRACT

The genus *Rubus* L. is considered one of the most complex genera of the Rosaceae family; parallel hybridization events and reticulate evolution have caused difficulties in its taxonomic classification. In total, 14 subgenera are recognized from which three, *Rubus*, *Orobatus* and *Idaeobatus*, are found in Ecuador with 21 species. To corroborate the phylogenetic relationship among the Ecuadorian *Rubus* species, phylogenetic trees were constructed using the ITS nuclear (nrDNA) region and the trnL-trnF, trnS-trnG and the trnG intron regions of the chloroplast DNA (cpDNA). In addition, ITS and trnL-trnF sequences from different species and subgenera of *Rubus* and of *Rosa multiflora*, *Fragaria chiloensis* y *Potentilla argentea* (outgroups) were downloaded from GenBank to evaluate the position of the Ecuadorian species compared to the rest of the subgenera of *Rubus* worldwide. Phylogenetic analysis of 26 samples of 15 *Rubus* species of Ecuador were done, being this the first time that molecular information of subgenus *Orobatus* and some species of subgenus *Rubus* is provided. All the phylogenetic analysis showed the genus *Rubus* as a monophyletic group. The worldwide analysis showed a tendency of the Ecuadorian species to form an isolated clade from the rest of the world species. The *Malachobatus* and *Idaeobatus* subgenera were shown as monophyletic and polyphyletic groups, respectively, while the others did not show any clear phylogenetic resolution. In the national analysis, a partial monophyly of *Rubus* and *Orobatus* (nrDNA) and a complete monophyly of *Idaeobatus* was revealed, partially corroborating the morphological classification of the Ecuadorian species. Generally, there was not any clear interspecific phylogenetic resolution and incongruences among the nuclear and chloroplast phylogenetic were observed, perhaps because of the hybrid origin of many species of this genus. To sum up, *Rubus* is a monophyletic genus whose species present a complex evolutionary history which makes it harder to do any phylogenetic study. The implementation of more DNA regions and other related studies in different subjects will be required to understand in a better way the taxonomy and evolutionary history of this genus.

**Keywords:** cpDNA, hybridization, ITS, nrDNA, phylogeny, reticulate evolution, Rosaceae, *Rubus*.

### 3. INTRODUCCIÓN

La familia Rosaceae Juss. es considerada como una de las familias de angiospermas más importantes a nivel económico, especialmente en regiones templadas (Dirlewanger et al., 2006). Esta familia se destaca por la presencia de una gran cantidad de especies con frutos o semillas comestibles, de uso ornamental, uso medicinal y de producción de madera, además de su rol ecológico en muchas comunidades (Hummer y Janick, 2009; Shulaev, 2008). Según datos de la Organización de Comida y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), la producción de frutos y semillas comestibles de la familia Rosaceae en 2016 fue de alrededor de 175 millones de toneladas con un valor total de 165 mil millones de dólares (USD) (Crops, 2018; Value of Agricultural Crops, 2018). Si se suma el valor del comercio de flores, plantas ornamentales y la producción de madera de esta familia, la cifra mencionada anteriormente se incrementaría en al menos un 50%.

A nivel mundial, la familia Rosaceae abarca alrededor de 90 géneros y 3.000 especies (Judd, Campbell, Kellogg, Stevens y Donoghue, 2016; Lingdi et al., 2003; Potter et al., 2007) volviéndola la 19<sup>na</sup> familia más diversa de angiospermas del mundo (Hummer y Janick, 2009). Tradicionalmente, ha existido complejidad en la clasificación taxonómica de la familia. Schulze-Mens (1964) clasifica a los taxa dentro de la familia en base a sus frutos (aquenios y otros, folículos, drupas y pomos), y reconoce cuatro subfamilias (Rosoideae, Dryadeae, Spiraeoideae y Maloideae) y varias tribus. El mismo año, Hutchinson, en base a información geográfica, vegetativa y reproductiva, propone otro método de clasificación compuesto únicamente por tribus (Roseae, Rubeae, Poteriae, Potentilleae, Dryadeae, Cerocarpeae, Quillajeae, Kerrieae, Rhodotypeae, Osmaronieae, Pruneae, Adenostomateae, Gilenieae, Spiraeae, Holodisceae, Neilieae, Pomeae y Crataegeae). Posteriormente, Takhtajan (1997), en base a información molecular, formula dividir a la familia Rosaceae en 12 subfamilias (Fillipenduloideae, Rosoideae, Ruboideae, Potentilloideae, Dryadeae, Colegynoideae, Kerrioideae, Amygdaloideae, Exochordeae, Spiraeoideae, Pyroideae y Dichotomanthoideae). Más tarde, Kalkman (2004), utilizando información acerca de la ecología, biología reproductiva y vegetativa, y fitoquímica, propone dos subfamilias para Rosaceae, la primera familia se conformaba de la fusión de Rosoideae y Prunoideae, y la segunda, por la fusión de Maloideae y Spiraeoideae. Finalmente, Potter et al. (2007), hace uso de varias secuencias nucleares y cloroplásticas de algunos géneros

representativos de la familia Rosaceae y la dividen en tres subfamilias (Rosoideae, Dryadoideae y Spiradoideae) y diferentes tribus.

Dentro de la familia Rosaceae, el género *Rubus* L. comprende aproximadamente el 35% de los taxa con un aproximado de 400–1000 especies, con distribución, mayormente, en regiones templadas del Norte y Asia (Judd et al., 2016; Lingdi y Boufford, 2003; Wang et al., 2016b). Este género se ubica dentro de la subfamilia Rosoideae (Kalkman, 2004; Potter et al., 2007; Schulze-Mens, 1964), aunque su clasificación dentro de esta ha sido modificada según el tratamiento. Schulze-Mens (1964) y Hutchinson (1964) ubicaron a *Rubus* dentro de la tribu Rubeae, aunque el primer autor reconoce a *Dalibarda* L. como género y lo ubica dentro de esta tribu, mientras Hutchinson ubica a *Dalibarda* como sinónimo de *Rubus*. Takhtajan (1997) clasifica al género *Rubus* dentro de la subfamilia Ruboideae como único representante. Kalkman (2004) vuelve a proponer la tribu Rubeae como lo hizo Hutchinson (1964). Finalmente, Potter et al. (2007) agrupan a *Rubus* con *Rosa* L. en la supertribu Rosodae. Actualmente, se utiliza el método de clasificación de Potter et al. (2007) con algunas modificaciones, entre ellas, *Rubus* se encuentra dentro de la tribu Rubeae como su único representante.

### **3.1. IMPORTANCIA MUNDIAL DEL GÉNERO *RUBUS* L.**

Las frutas conocidas como moras, frambuesas y, en general zarzas pertenecen a distintas especies del género *Rubus* L., volviéndolo uno de los géneros de plantas alimenticias más importantes del mundo, tanto de la antigüedad como de la actualidad (Dennell, 1976; Hummer y Janick, 2009). Se han encontrado semillas de mora (*Rubus fruticosus* L.) en distintos sitios arqueológicos, lo cual sugiere el uso y consumo de esta especie por civilizaciones antiguas (Dennell, 1976). Actualmente, el uso de distintas especies de este género ha ido incrementando, especialmente de especies comerciales como la frambuesa (*R. idaeus* L.), moras (*R. ulmifolius* Schott., *R. fruticosus*, L.) y sus híbridos (Hummer y Janick, 2009). Según datos de la FAO, en 2016, la producción de *R. idaeus* y algunos híbridos alcanzó, aproximadamente, las 795.249 toneladas con un avalúo de aproximadamente 3,7 mil millones de dólares (USD) (Crops, 2018; Value of Agricultural Crops, 2018).

Los frutos de *Rubus* son altamente cotizados por sus características fitoquímicas. A diferencia de los frutos de otras especies las frambuesas, moras y zarzas presentan altas concentraciones de antocianinas, fenoles totales, vitaminas y nutrientes; además, presentan concentraciones bajas de carbohidratos, lo cual las vuelve una buena fuente de fitoquímicos para la dieta diaria humana (Deighton, Brennan, Finn y Davies, 2000; Garzón, Riedl y Schwartz, 2009; Moyer, Hummer, Finn, Frei, y Wrolstad, 2002).

Las especies de *Rubus* que no tienen un “valor” de exportación presentan importancia dentro de su rango nativo. Por ejemplo, *Rubus chamaemorus* L. es sumamente importante para los pueblos árticos donde es una de las primeras “bayas” en ser recolectadas durante la primavera (Karst y Turner, 2011). La mora de castilla, *Rubus glaucus* Benth. es utilizada en todo su rango nativo, produciéndose 800.000 toneladas anuales en Colombia para consumo interno (Garzón, Riedl y Schwartz, 2009). Todas las especies ecuatorianas de *Rubus* son utilizadas como alimento para humanos o animales (*Rubus adenotrichos* Schldl., *R. boliviensis* Focke, *R. niveus* Thunb., *R. roseus* Poir.), aunque presentan un mayor número de usos como *R. glabratus* Kunth, cuyos frutos son utilizados para la producción de colorante vegetal (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía y Balslev, 2008). *Rubus adenotrichos*, *R. floribundus* Kunth, *R. glaucus*, *R. niveus* y *R. urticifolius* Poir. son utilizados como cercas vivas por distintas etnias de la sierra ecuatoriana (De la Torre et al., 2008). Además, se utilizan las flores, hojas o frutos de *R. acanthophyllos* Focke, *R. adenotrichos*, *R. floribundus*, *R. glabratus*, *R. glaucus* y *R. niveus* como medicina para tratar varias afecciones (Azahuanche, Hurtado, Rubio, Ávalos y Aponte, 2015; De la Torre et al., 2008).

### **3.2. TAXONOMÍA DE RUBUS L.**

El género *Rubus* L. comprende arbustos o subarbustos, lianas, plantas rastreras o trepadoras. Tallos erectos, trepadores o postrados mayormente estoloníferos; glabros o pubescentes, a veces con glándulas estipitadas o sésiles; usualmente con espinas. Estípulas adnatas a la base del peciolo, no divididas o habitualmente lobadas, persistentes o caducas. Hojas alternas, pecioladas; simples, palamati o pinnaticompuestas, glabras o pubescentes, a veces con glándulas estipitadas o sésiles, usualmente con espinas, rara vez ausentes. Inflorescencia en panículas cimosas, racimos o corimbos, o flores simples. Flores bisexuales, generalmente pentámeras; sépalos persistentes, erectos o reflexos; pétalos blancos, rosas o rojos, glabro o pubescente;

estambres numerosos, insertados en el hipantio, filamentos filiformes, anteras dídimas; carpelos numerosos, 2 óvulos por lóculo, solo 1 óvulo se desarrolla, estilo filiforme, subterminal, glabro o pubescente, estigma simple, capitado. Fruto agregado de drupeolas adnatas o no al receptáculo, rojo, amarillo, morado o negro; semillas péndulas, testa membranosa; cotiledón plano-convexo (Lingdi y Boufford, 2003; Romoleroux, 1996). Además de las características mencionadas anteriormente, algunas especies de Asia presentan flores unisexuales con plantas dioicas, y pocos estambres y carpelos (Lingdi y Boufford, 2003; Romoleroux, 1996).

Actualmente, el género *Rubus* se encuentra dividido en 14 subgéneros, 23 secciones, 6 subsecciones, 40 series y 14 subseries (Bean, 1997; Focke 1910, 1911, 1914; Kalkman, 1987). La mayor parte de los subgéneros reconocidos en la actualidad fueron propuestos por Focke (1910, 1911, 1914), quien realizó la única revisión taxonómica mundial de este género. En este trabajo, Focke reconoció 12 subgéneros: *Idaeobatus* (Focke) Focke, *Malachobatus* (Focke) Focke, *Rubus* L. (= *Eubatus* Focke) (Jarvis, 1992), *Anoplobatus* (Focke) Focke, *Chamaebatus* (Focke) Focke, *Chamaemorus* (Hill) Focke, *Comaropsis* (Rich.) Focke, *Cylactis* (Raf.) Focke, *Dalibarda* (L.) Focke, *Dalibardastrum* Focke, *Lampobatus* Focke y *Orobatus* Focke. Posteriormente, Kalkman (1987) y Bean (1997) adicionaron dos nuevos subgéneros, *Micranthobatus* (Fritsch) Kalkman y *Diemenicus* A. R. Bean, a la clasificación infragenérica de *Rubus* propuesta por Focke.

La taxonomía del género *Rubus* es compleja debido a distintos factores. Aunque posee especies diploides ( $2n=14$ ), al igual que con el 60% de angiospermas, la mayor parte de las especies de *Rubus* tiene un origen poliploide llegando a presentar especies octodecaploides ( $18n=126$ ) (Soltis y Soltis, 1999; Thompson, 1995, 1997; Vamosi y Dickinson, 2006). A esto se suma la facilidad que tienen distintas especies del género para hibridizar, ya sea con taxa cercanos o distantes (Alice, Eriksson, Eriksen y Campbell, 2001; Mimura, Mishima, Lascoux y Yahara, 2014) y procesos de evolución reticulada (Sochor, Vašut, Sharbel, y Trávníček, 2015). Como resultado, se pueden encontrar individuos con características morfológicas distintas a las especies descritas, y es difícil discernir si se trata de una especie no descrita o un híbrido. Inclusive, a nivel infragenérico no se logran encontrar respuestas, pues la mayoría de los subgéneros son poliploides; únicamente los subgéneros *Idaeobatus*, *Dalibarda*, *Anoplobatus* y ciertas especies sudamericanas de *Rubus* presentan especies diploides (Alice y Campbell, 1999; Thompson, 1995, 1997).

### 3.3. DIVERSIDAD DE *RUBUS* EN ECUADOR

En Ecuador se encuentran registradas 21 especies de *Rubus* clasificadas en tres subgéneros: *Orobatus*, *Rubus* e *Idaeobatus*. El subgénero *Idaeobatus* se distribuye, principalmente, en Asia, Oceanía y una parte de África (Focke 1910, 1911, 1914). En Ecuador, las dos especies de este subgénero (*R. niveus* Thunb. y *R. ellipticus* Sm.) son introducidas y se caracterizan, principalmente, por su fruto que cae sin el receptáculo (Romoleroux, 1996). El subgénero *Orobatus* contiene 12 especies en total, de las cuales nueve se encuentran en Ecuador, entre ellas, dos son endémicas, *Rubus laegaardii* Romol. y *R. azuayensis* Romol. (Romoleroux, 2011). La distribución de este subgénero está restringida a Sudamérica y se caracteriza por la presencia de estípulas suborbiculares y el fruto que cae con el receptáculo (Romoleroux, 1996). Finalmente, el subgénero *Rubus* se caracteriza por la presencia de estípulas subuladas, el hábito principalmente arbustivo y el fruto que cae con el receptáculo. En Ecuador, 10 especies pertenecen a este subgénero (Romoleroux, 1996).

### 3.4. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS

La taxonomía tradicional basada en morfología se vuelve inútil cuando los caracteres entre dos especies son muy semejantes entre sí o su tamaño es muy reducido. Por esta razón, el análisis de la información molecular, es decir, de secuencias de ADN o de proteínas es fundamental para dilucidar las relaciones evolutivas entre las especies (Lemey, Salemi y Vandamme, 2009). En plantas, el uso de ADN cloroplástico (cpDNA), especialmente de regiones no codificantes, debido a su origen (herencia materna) ha ido en aumento (Shaw, Lickey, Schilling y Small, 2007). La abundancia del cpDNA en plantas, así como, tasas de sustitución lentas, permite obtener información confiable acerca de la historia evolutiva al momento de elaborar árboles filogenéticos (Shaw et al., 2005). Sin embargo, el ADN nuclear (nrDNA), especialmente el espaciador interno transcrito (ITS), una región no codificante de ADN ribosómico nuclear ha permitido discriminar entre especies distintas por sus altos porcentajes de regiones parsimoniosamente informativas entre especies (Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1995; Newmaster, Fazekas y Ragupathy, 2006).

En el caso de *Rubus*, los estudios filogenéticos se concentran mayormente en la diversidad por país (Wang et al., 2016b; Yang y Pak, 2006; Yang, Yoon y Pak, 2012), siendo Alice y

Campbell (1999) y Sutherland et al. (2008) los únicos en incluir muestras de distintos países. Además, estudios como los de Sutherland et al. (2008) y Yang et al. (2012) fueron elaborados en base a información que poseían previamente. Sutherland et al. (2008) utilizaron los datos de Alice y Campbell (1999) y adicionaron la información de algunas especies de *Rubus* de Bután y otra región de ADN (trnL-trnF). Estos autores encontraron diferencias entre la ubicación de las especies en los árboles filogenéticos nucleares y cloroplásticos, algo no observado en los resultados de Alice y Campbell (1999), además de la ubicación de las especies de Bután en los subgéneros de *Rubus*. Por otro lado, Yang et al. (2012) utilizaron la información de Yang y Pak (2006) a la cual adicionaron una región nuclear (intrón LEAFY), siendo las topologías de los árboles nucleares de ambos estudios muy similares entre sí, aunque el intrón LEAFY utilizado por Yang et al. (2012) resultó más informativo que la región ITS utilizada por Yang y Pak (2006).

### **3.5. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Existen estudios filogenéticos del género *Rubus* (Alice y Campbell, 1999; Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b; Yang y Pak, 2006; Yang et al., 2012). Sin embargo, ninguno refleja completamente la diversidad del género presente en Ecuador. Yang y Pak (2006), Yang et al. (2012) y Wang et al. (2016) realizaron sus estudios filogenéticos del género *Rubus* con especies de Corea y China, respectivamente, en las cuales incluyeron tan solo una muestra como representante del subgénero *Rubus*. Los estudios de Alice y Campbell (1999) y Sutherland et al. (2008) fueron los únicos en incluir muestras de *Rubus* de distintos países y la mayor parte de los subgéneros reconocidos para el género *Rubus* (10 de 14) para entender las relaciones evolutivas de este género. Sin embargo, tan solo se utilizó una muestra de Ecuador, *Rubus urticifolius* Poir., para representar al subgénero *Rubus* y no se utilizó a ningún miembro del subgénero *Orobatus*. A nivel de Sudamérica, Marulanda, López y Aguilar (2007), intentaron diferenciar molecularmente a distintos cultivos de mora de castilla (*R. glaucus*) y a las especies colombianas de *Rubus*. Lamentablemente, utilizaron microsatélites y AFLPs y no hicieron uso de regiones cloroplásticas por lo cual sus resultados no pueden ser comparados con la información proveniente de otros estudios (Alice y Campbell, 1999; Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b; Yang y Pak, 2006; Yang et al., 2012).

En este estudio se busca esclarecer y comprender las relaciones evolutivas de las especies ecuatorianas del género *Rubus*, y su ubicación filogenética, mediante el uso de regiones cloroplásticas y nucleares, y mediante la comparación con la información disponible de las especies de otros subgéneros no distribuidos en Ecuador. Además, el presente trabajo constituye el primer esfuerzo de inclusión de información molecular de regiones nucleares y cloroplásticas del subgénero *Orobatus* y de una porción representativa del subgénero *Rubus* en un mismo estudio.

### **3.6. OBJETIVOS**

#### **3.6.1. OBJETIVO GENERAL**

Esclarecer las relaciones evolutivas de las especies del género *Rubus* presentes en Ecuador, y la ubicación filogenética que estas mantienen dentro de la única clasificación infragenérica existente.

#### **3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las relaciones filogenéticas de las especies ecuatorianas de *Rubus* con otras especies del mundo enmarcadas dentro de la clasificación infragenérica del género.
- Corroborar la clasificación morfológica actual de las especies de *Rubus* de Ecuador mediante análisis filogenéticos.
- Verificar la eficiencia del uso de una región de ADN cloroplástico codificante (*rbcL*), cuatro regiones de ADN cloroplástico no codificante (*trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UUC</sup>*, intrón *trnG<sup>UUC</sup>*, *trnL<sup>UAA</sup>-trnF<sup>GAA</sup>*, *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*), y una región ADN ribosómico nuclear no codificante (ITS) en estudios filogenéticos con el género *Rubus* en Ecuador.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras del género *Rubus* fueron recolectadas en las provincias de Azuay, Carchi, Imbabura, Loja y Pichincha en la sierra; y en las estribaciones surorientales de Morona Santiago y Zamora Chinchipe, en un rango altitudinal desde 1.500 hasta 3.900 m.s.n.m. Todos los especímenes fueron recolectados bajo los permisos de investigación N° 011-2016-IC-FLO--DNB/MA y N° 012-2017-IC-FLO--DNB/MA. El trabajo molecular se amparó bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAE—DNB—CM—2018—0082, emitidos por el Ministerio de Ambiente de Ecuador (MAE).

La recolección de los especímenes se realizó en los meses de agosto y septiembre de 2016 y febrero y septiembre de 2017. En su mayoría, se intentó recolectar las muestras cuando estas se encontraban en estado reproductivo y según su tipo de hábito. En el caso de los arbustos escandentes o ascendentes, se recogió una rama basal (rama foliar más cercana al tronco o a la base de la planta), una rama con flores y una con frutos (maduros e inmaduros). Para plantas rastreras y trepadoras, se recolectó un individuo, de preferencia con raíces o con la mayor cantidad de tallo posible. Cuando se trataba de lianas, estas fueron jaladas hasta que la planta cayó de la copa del árbol y se recolectó el material disponible. Durante el prensado de las muestras se procuró almacenar una hoja compuesta, o 2 a 3 en el caso de hojas simples en sílica gel. Las muestras fueron identificadas, morfológicamente, en base a material del Herbario QCA y bibliografía disponible (Anexo 1) (Romoleroux, 1996).

### 4.2. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN fue llevada a cabo según el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones. Las muestras almacenadas en sílica gel fueron molidas en seco con un mortero y pistilo hasta obtener una consistencia similar a polvo. Se realizó la extracción orgánica de ADN con 40 mg de este polvo; además, se utilizó alcohol isoamílico en vez de fenol y se repitieron los lavados de etanol según la apariencia de la muestra. Seguidamente, las muestras fueron almacenadas en 100  $\mu$ L de una solución de búffer Tris-EDTA (TE) 0.1X y evaluadas en

NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, 2010) para determinar la concentración total de ADN (ng/ $\mu$ L). Posteriormente, se realizaron alícuotas de 25 ng/ $\mu$ L de todas las muestras de ADN en agua libre de ADNasa y ARNasa (Ultra Pure Distilled Water, Invitrogen).

### 4.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN

#### 4.3.1. SELECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

Para el análisis de cpDNA se seleccionó una región codificante, *rbcL*, y cuatro regiones no codificantes: el espaciador intergénico *trnS<sup>GCU</sup>-trnG<sup>UUC</sup>*, el intrón *trnG<sup>UUC</sup>*, el espaciador intergénico *trnL<sup>UAA</sup>-trnF<sup>GAA</sup>* y el espaciador intergénico *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* (Anexo 2). En la región nuclear nrDNA se utilizó una región no codificante de ADN ribosómico (rDNA), el espaciador interno transcrito (ITS) (Anexo 2), conformado por los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 y la subunidad de 5.8S (rDNA). Todas las regiones seleccionadas han sido reportadas como altamente variables, con buenos resultados en estudios filogenéticos a nivel intra e intergenérico, intra e interespecífico en angiospermas (Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1995; Shaw, Lickey, Schilling y Small, 2007; Shaw et al., 2005).

La región *rbcL* fue incluida por su relevancia en procesos de *bar-coding*, la presencia de cebadores universales que amplifican casi todos los taxa de angiospermas, y la gran cantidad de secuencias de diferentes taxa de angiospermas disponibles en GenBank (National Center for Biotechnology Information) (Kress y Erickson, 2007; Newmaster et al., 2006). Las regiones *trnL-trnF*, *psbA-trnH* y *trnS-trnG* fueron incluidas por su abundancia en los estudios moleculares de *Rubus* (Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b; Yang y Pak, 2006). La región ITS ha sido utilizada previamente en estudios filogenéticos enfocados o que contenían al género *Rubus* y presenta una gran cantidad de secuencias de distintos taxa en Gen Bank (Alice y Campbell, 1999; Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b; Yang y Pak, 2006).

### **4.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La amplificación de los fragmentos de ADN de las regiones ITS, trnS-trnG trnL-trnF, trnH-psbA, rbcL e intrón trnG fue realizada mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las amplificaciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Yang y Pak (2006) con algunas modificaciones con un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  con las siguientes características: 13.25  $\mu\text{L}$  de agua libre de ADNasa y ARNasa (Ultra Pure Distilled Water, Invitrogen), 0.25  $\mu\text{L}$  de polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$  (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen), 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer para PCR sin  $\text{MgCl}_2$  10X (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen), 1-2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10mM (GeneAmp, Dntp Mix with dTTP, Applied Biosystems), 2  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores 10 $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{L}$  de ADN (25 ng/ $\mu\text{L}$ ).

El programa de amplificación fue de 95°C por 3 minutos para la denaturación inicial, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto para la denaturación, 50°C por 1 minuto para la hibridación y 72°C por 1 minuto (se incrementó 1 segundo cada ciclo) para la extensión; y una extensión final de 72°C por 7 minutos. Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un Termociclador Multigene Gradient (Labnet).

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-borato-EDTA). Se cargó 2.5  $\mu\text{L}$  del producto de la PCR junto con 0,5  $\mu\text{L}$  del buffer de carga (6X DNA Loading Dye, ThermoScientific) en cada pocillo del gel de agarosa. Adicionalmente, en cada gel se cargó 3  $\mu\text{L}$  de la escalera molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, ThermoScientific) para determinar el tamaño y concentración de los productos de las amplificaciones. El gel cargado fue corrido durante 1 hora a 90 V, tras lo cual se visualizó el gel en un transiluminador de luz UV.

### **4.4. SECUENCIAMIENTO AUTOMÁTICO**

Los amplicones con una concentración adecuada fueron purificados mediante el uso de ExoSap (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, ThermoScientific). Según las instrucciones del fabricante, se adicionó 2.25  $\mu\text{L}$  de una solución de ExoSap 30% a 22.5  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR. El termociclador fue programado a 37°C por 30 minutos y 80°C por 15 minutos.

Finalmente, las muestras purificadas fueron enviadas al laboratorio comercial Macrogen Corea para su secuenciamiento.

## **4.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

### **4.5.1. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS**

Las secuencias fueron editadas en el programa Geneious ver. 10.1.2. Se utilizó a *Acaena ovalifolia* Ruiz y Pav. como grupo externo para los análisis de las muestras ecuatorianas, y también se incluyeron secuencias descargadas de GenBank de *Potentilla argentea* L. y *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. del estudio de Feng et al. (2017). Por otro lado, para el análisis mundial de *Rubus* se obtuvieron 39 secuencias de GenBank de estudios que incluyeron a la región ITS y la región trnL-trnF (Sutherland et al., 2008; Yang y Pak, 2006) y se utilizó a *Rosa multiflora* Thunb. (Anexo 3) y *A. ovalifolia* como grupo externo. En el caso de la región ITS, se adicionaron 19 secuencias de Ecuador a las 39 secuencias de estudios anteriores para un total de 58 muestras excluyendo a los grupos externos. Mientras tanto, en el análisis de la región trnL-trnF, se adicionaron 26 secuencias ecuatorianas a las 39 para un total de 65 especímenes excluyendo al grupo externo.

El alineamiento de las secuencias obtenidas fue realizado utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004a, 2004b) dentro del programa Geneious; a continuación, las inconsistencias encontradas (duplicaciones, deleciones, errores de alineamiento) fueron corregidas manualmente.

### **4.5.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

Se realizaron análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana para dos sets de datos (Wang et al., 2016b). El primero incluyó el análisis mundial del género *Rubus*, donde se integró la información de Ecuador a la descargada del GenBank. El segundo set se enfocó exclusivamente en las muestras ecuatorianas. Para el primer análisis se incluyó solo información nuclear de la región ITS y la cloroplástica de la región trnL-trnF. En el segundo análisis, se incluyó la información nuclear de la región ITS y la cloroplástica del conjunto de datos de las regiones trnL-trnF, trnS-trnG y el intrón trnG.

Se utilizó el programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy, Minh, Wong, von Haeseler y Jermin, 2017) para la selección del mejor modelo de sustitución de ADN, utilizando el Criterio Bayesiano de Información (BIC). En el caso de las regiones del análisis mundial de *Rubus*, el mejor modelo para la región ITS fue SYM + G, mientras que para trnL-trnF fue HKY + G. Por otro lado, los mejores modelos para las regiones del análisis nacional fueron las siguientes: región ITS, GTR + I; espaciador trnL-trnF y espaciador trnS-trnG, HKY + G; y el intrón trnG, GTR + G. En el caso del conjunto de datos cloroplásticos se realizaron 3 particiones, una para cada región de ADN del cloroplasto.

Los análisis de Máxima Verosimilitud (ML) se llevaron a cabo con el software IQ Tree (Nguyen, Schmidt, von Haeseler y Minh, 2014). Se realizaron análisis de reconstrucción de árboles a partir del set de las secuencias alineadas. Posteriormente, se realizaron 10.000 réplicas de Bootstrap para dar soporte a las ramas y se evaluaron los soportes de las ramas con 10.000 repeticiones (Hoang, Chernomor, von Haeseler, Minh, y Vinh, 2017). El árbol consenso fue generado bajo el valor de la regla de la mayoría, establecido en el 50%. Los valores menores a 70 se consideraron como soporte bajo; entre 70 y 85, soporte medio; y mayores o iguales a 85, como soporte alto según lo estipulado por Wang et al. (2016b).

Los análisis de Inferencia Bayesiana (BI) fueron realizados en Mr. Bayes v.3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Para todos los datos se corrieron cuatro análisis independientes utilizando el algoritmo de la cadena de Markov de Monte Carlo (Markov chain Monte Carlo: MCMC) (Hastings, 1970; Metropolis, Rosenbluth, Rosenbluth, Teller y Teller, 1953) con cuatro cadenas, con una temperatura de 0.1, tomando datos cada 1 000 generaciones por  $2 \cdot 10^6$  y  $10^7$  generaciones, para los análisis nacionales y mundiales, respectivamente. Se procedió a analizar los valores de verosimilitud (log-likelihood) y se descartó el 10% de los datos. Finalmente, se obtuvo el árbol consenso con la regla de la mayoría del 50%. Se consideraron a las probabilidades posteriores menores o iguales a 95, como soporte alto; y a las mayores a 95, como soporte bajo.

Los árboles filogenéticos derivados de los análisis previos fueron editados en el programa estadístico R: The R Project for Statistical Computing (R Core Team, 2014) manejado a través de la interfaz R Studio (RStudio Team, 2016), mediante los paquetes:

1. **Treeio** (Yu, 2018): Ingreso de archivos obtenidos de IQ Tree y Mr. Bayes.
2. **ggtree** (Yu, Smith, Zhu, Guan y Lam, 2017): Edición de árboles filogenéticos.
3. **evobiR** (Blackmon y Adams, 2015): Concatenamiento de las regiones del set de ADN cloroplástico.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectó material botánico para 20 de las 21 especies registradas por Romoleroux (1996) con un total de 138 especímenes clasificados en los tres subgéneros presentes en Ecuador (Figuras 1, 2 y 3; Tabla 1), *R. compactus* Benth. fue la única especie no muestreada. Entre las muestras recolectadas se identificaron dos especies introducidas, *R. rosifolius* Sm. y *R. ulmifolius* Schldl., que no habían sido registradas para Ecuador continental anteriormente.

### 5.2. ANÁLISIS MOLECULAR

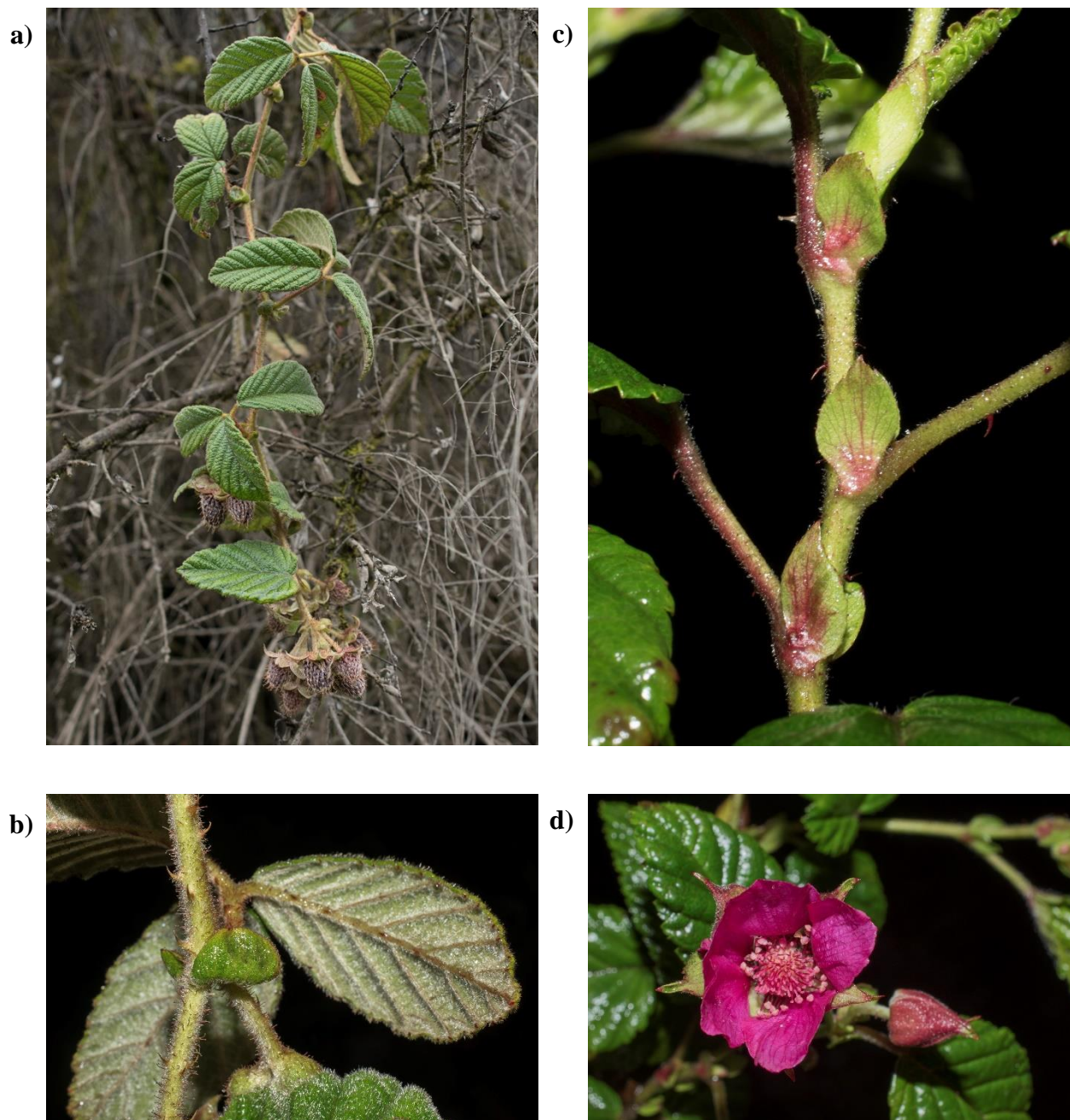
Después de la amplificación y secuenciamiento preliminar de las seis regiones de ADN vegetal, se descartaron del estudio a las regiones trnH<sup>GUG</sup>-psbA y rbcL. La región trnH<sup>GUG</sup>-psbA fue eliminada pues no logró ser amplificada en algunas especies (*R. acanthophyllos*, *R. adenothallus* Focke, *R. ellipticus* Sm., *R. glaucus*, *R. laegaardii*, *R. killipii* A. Berger y *R. niveus*), y presentó una región poli-A muy extensa durante el secuenciamiento en la mayoría del resto de las especies (*R. boliviensis*, *R. coriaceus* Poir., *R. nubigenus* Kunth, *R. peruvianus* Fritsch., *R. rosifolius* y *R. urticifolius*) por lo que generó ruido en el electrofenograma. Por otro lado, la región rbcL, a pesar de haber sido amplificada y secuenciada con éxito, presentó muy poca variación entre las especies nativas de Ecuador.

En total, se obtuvo secuencias de 26 especímenes, correspondientes a 15 especies de *Rubus* sin incluir al grupo externo, *A. ovalifolia* (Tabla 2). Este es el primer reporte de información molecular del subgénero *Orobatus* y de las especies ecuatorianas del subgénero *Rubus*, excluyendo a *R. urticifolius* (Sutherland et al., 2008).

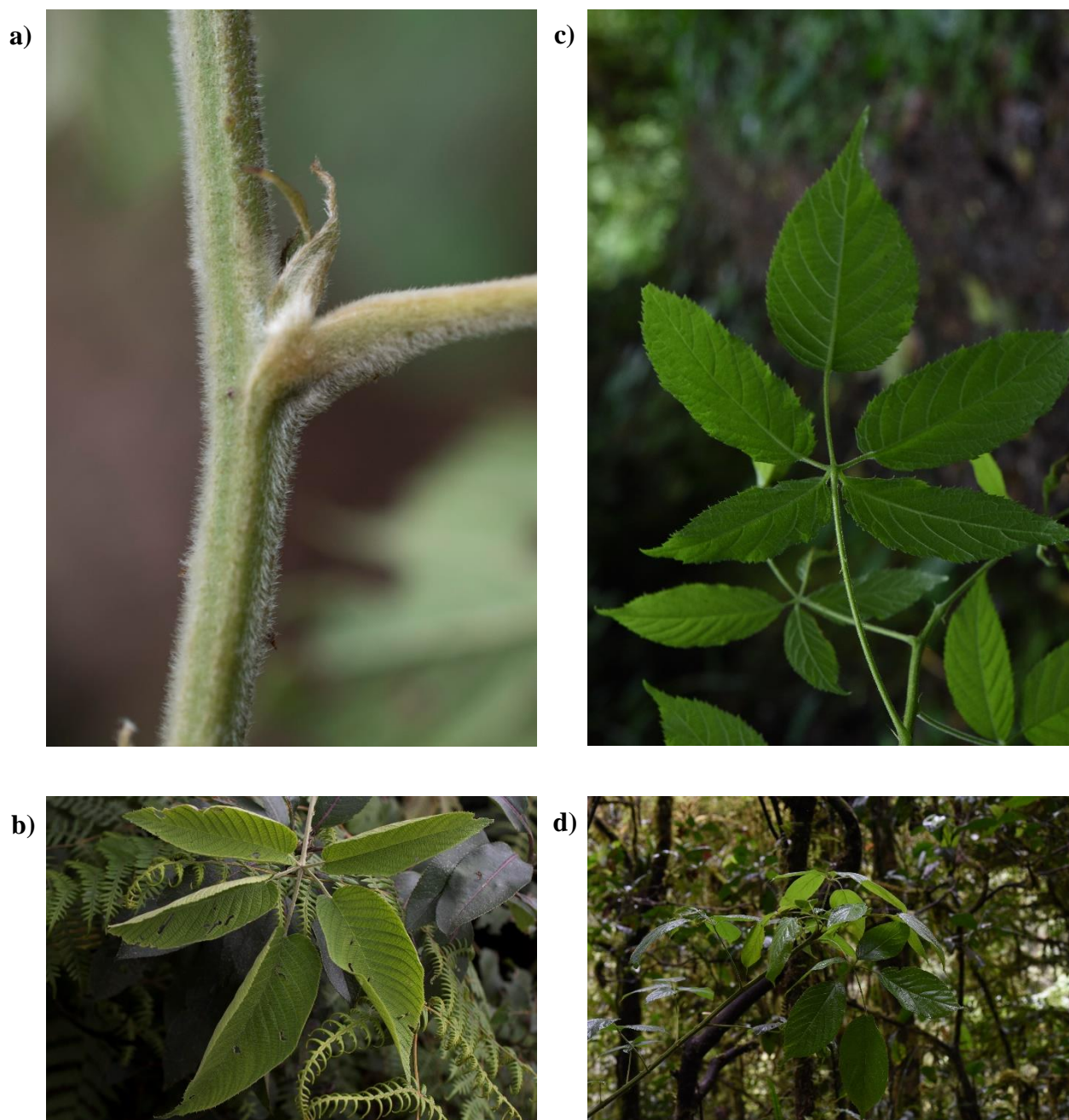
### 5.3. ANÁLISIS MUNDIAL DE *RUBUS*

Los análisis filogenéticos a nivel mundial incluyeron las secuencias de Ecuador a las que se adicionó información de Sutherland et al. (2008) y Yang y Pak (2006). En total se representaron 10 de los 14 subgéneros de *Rubus* (*Anoplobatus*, *Chamaebatus*, *Comaropsis*, *Cylactis*, *Dalibarda*,

*Dalibardastrum*, *Idaeobatus*, *Malachobatus*, *Orobatus* y *Rubus*) y 43 especies de este género, además de los grupos externos, *A. ovalifolia* y *Rosa multiflora*.



**Figura 1. Representantes del subgénero *Orobatus*.** *Rubus nubigenus* Kunth: a) hábito, b) estípula. *Rubus coriaceus* Poir: c) tallo y estípulas, d) flores. Fotografías tomadas por Esteban Bastidas.



**Figura 2. Representantes del subgénero *Rubus*.** *Rubus floribundus* Kunth: a) estípula, b) hoja. *Rubus killipii* A. Berger: c) hoja y estípula, d) hábito. Fotografías tomadas por Esteban Bastidas.



**Figura 3. Representantes del subgénero *Idaeobatus*. *Rubus ellipticus* Sm.:** a) tallo, estípula y pubescencia, b) fruto maduro y botones. *Rubus rosifolius* Sm.: c) hábito, d) hojas y frutos inmaduros. Fotografías tomadas por Esteban Bastidas.

Tabla 1. Lista de especímenes recolectados.

Determinación	Provincia	Códigos de recolección	Altitud (m)	Fecha
<i>Acaena ovalifolia</i> Ruiz & Pav.	Azuay	DE53	3188	24-sep-16
<i>Rubus acanthophyllos</i> Focke	Loja	DE122–123, DE127–130	3301	17-sep-17
<i>Rubus</i> cf. <i>acanthophyllos</i> Focke	Azuay	DE110–111	3338	22-feb-17
<i>Rubus adenothallus</i> Focke	Azuay	DE50–51	3188	24-sep-16
<i>Rubus adenotrichos</i> Schldl.	Pichincha	DE154	2820	22-may-18
<i>Rubus azuayensis</i> Romol.	Azuay	DE112–115	3316	22-feb-17
	Loja	DE101–102, DE109	3204–3368	21-feb-17
		DE135–136, DE142, DE145	3200–3214	18-sep-17
<i>Rubus bogotensis</i> Kunth	Imbabura	DE14	3362	24-aug-16
	Loja	DE76	2456	26-sep-16
		DE121	2364	17-sep-17
		DE148	2456	19-sep-17
<i>Rubus boliviensis</i> Focke	Carchi	DE28, DE37	1469–2947	25-aug-16
	Loja	DE57–59	1852–2507	25-sep-16
		DE83	2930	27-sep-16
		DE98–100	2992–3071	21-feb-17
		DE117–118	2430	17-sep-17
<i>Rubus coriaceus</i> Poir.	Zamora Chinchipe	DE65–66, DE72–73	2582–2697	26-sep-16
	Azuay	DE41–42	3710–3711	23-sep-16
		DE44–49	3188–3192	24-sep-16
		DE89–93	3969	28-sep-16
	Carchi	DE21–24	3901	25-aug-16
	Loja	DE150	3301	17-sep-17
<i>Rubus ellipticus</i> Sm.	Pichincha	DE151–153	2820	22-may-18
<i>Rubus floribundus</i> Kunth	Azuay	DE54	3188	24-sep-16
	Loja	DE84–85, DE88	2975–3047	27-sep-16
		DE96	2487	21-feb-17
		DE120	2364	17-sep-17
<i>Rubus glabratus</i> Kunth	Zamora Chinchipe	DE64	2092	26-sep-16
	Carchi	DE17–19	3512	25-aug-16
	Imbabura	DE9–11	3659	24-aug-16
<i>Rubus</i> cf. <i>glabratus</i> Kunth	Imbabura	DE8	3608	24-aug-16
<i>Rubus glaucus</i> Benth.	Carchi	DE34–35	1872	26-aug-16
	Loja	DE82	2681	27-sep-16
<i>Rubus killipii</i> A. Berger	Zamora Chinchipe	DE61–63	1040–1043	25-sep-16

**Tabla 1. Lista de especímenes recolectados. (Continuación).** Provincias, códigos de recolección, altitud y fecha de recolección de los especímenes.

Determinación	Provincia	Códigos de recolección	Altitud (m)	Fecha
<i>Rubus laegaardii</i> Romol.	Zamora Chinchipe	DE71	2664	26-sep-16
	Loja	DE80–81	3089	27-sep-16
		DE133–134, DE137–138, DE140–141, DE143	3200–3214	18-sep-17
		DE147	3089	19-sep-17
<i>Rubus loxensis</i> Benth.	Loja	DE97	2992	21-feb-17
		DE131–132, DE139	3200	18-sep-17
<i>Rubus megalococcus</i> Focke	Loja	DE104–105, DE108	3267–3366	21-feb-17
		DE146	3298	18-sep-17
<i>Rubus niveus</i> Thunb.	Carchi	DE30	1753	26-aug-16
	Imbabura	DE31	2230	27-aug-16
<i>Rubus nubigenus</i> Kunth	Carchi	DE16	3512	25-aug-16
	Imbabura	DE12–13	3599–3659	24-aug-16
	Loja	DE56	2786	25-sep-16
		DE124–125	3301	17-sep-17
<i>Rubus cf. nubigenus</i> Kunth	Zamora Chinchipe	DE68	2708	26-sep-16
	Carchi	DE26	2947	25-aug-16
<i>Rubus peruvianus</i> Fritsch	Azuay	DE43	3728	23-sep-16
		DE52, DE55	3034–3188	24-sep-16
	Loja	DE86–87	3047	27-sep-16
		DE103	3204	21-feb-17
<i>Rubus roseus</i> Poir.	Imbabura	DE15	3362	24-aug-16
	Loja	DE107	3370	21-feb-17
		DE116, DE119	2430	17-sep-17
		DE144	3214	18-sep-17
	Zamora Chinchipe	DE67, DE69–70, DE77	2708	26-sep-16
<i>Rubus rosifolius</i> Sm.	Carchi	DE31–33	1500	26-aug-16
	Loja	DE74–75	2356	26-sep-16
	Loja	DE94–95	2366	21-feb-17
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	Loja	DE94–95	2366	21-feb-17
<i>Rubus urticifolius</i> Poir.	Carchi	DE29	2039	26-aug-16
		DE36	1469	27-aug-16
	Zamora Chinchipe	DE60	945	25-sep-16
<i>Rubus</i> L.	Loja	DE78–79	3254	27-sep-16
		DE126	3301	17-sep-17
		DE149	2504	19-sep-17

**Tabla 2. Especímenes utilizados en el estudio filogenético.** Código de campo, determinación y regiones amplificadas de los especímenes utilizados en los análisis filogenéticos.

Código	Especie	Regiones analizadas			
		ITS	trnL-trnF	trnS-trnG	intrón trnG
DE122	<i>R. acanthophyllos</i>	X	X	—	X
DE130	<i>R. acanthophyllos</i>	—	X	—	—
DE50	<i>R. adenothallus</i>	—	X	—	—
DE14	<i>R. bogotensis</i>	X	—	—	X
DE28	<i>R. boliviensis</i>	X	X	X	X
DE42	<i>R. coriaceus</i>	X	X	X	X
DE44	<i>R. coriaceus</i>	X	X	X	X
KR5834	<i>R. ellipticus</i>	—	X	—	—
DE11	<i>R. glabratus</i>	X	X	X	X
DE34	<i>R. glaucus</i>	X	X	—	X
DE35	<i>R. glaucus</i>	X	X	—	X
DE82	<i>R. glaucus</i>	X	X	—	X
DE61	<i>R. killipii</i>	X	X	X	X
DE62	<i>R. killipii</i>	—	X	—	X
DE80	<i>R. laegaardii</i>	X	X	—	X
DE30	<i>R. niveus</i>	—	X	—	X
DE16	<i>R. nubigenus</i>	X	X	X	X
DE26	<i>R. nubigenus</i>	X	X	X	X
DE103	<i>R. peruvianus</i>	X	X	—	X
DE52	<i>R. peruvianus</i>	X	X	X	X
DE55	<i>R. peruvianus</i>	X	X	X	X
DE31	<i>R. rosifolius</i>	X	X	X	X
DE33	<i>R. rosifolius</i>	X	X	X	X
DE74	<i>R. rosifolius</i>	X	X	—	X
DE29	<i>R. urticifolius</i>	X	X	X	X
DE36	<i>R. urticifolius</i>	X	X	—	X
DE53	<i>Acaena ovalifolia</i>	X	X	X	X
FJ001	<i>Fragaria chiloensis</i> *	FJ356164	FJ422293	FJ422322	FJ422322
FN001	<i>Potentilla argentea</i> *	FN430808	FN961750	FN594719	FN594719

\*Muestras utilizadas por Feng et al. (2017) incluidas en el análisis

### 5.3.1. REGIÓN ITS

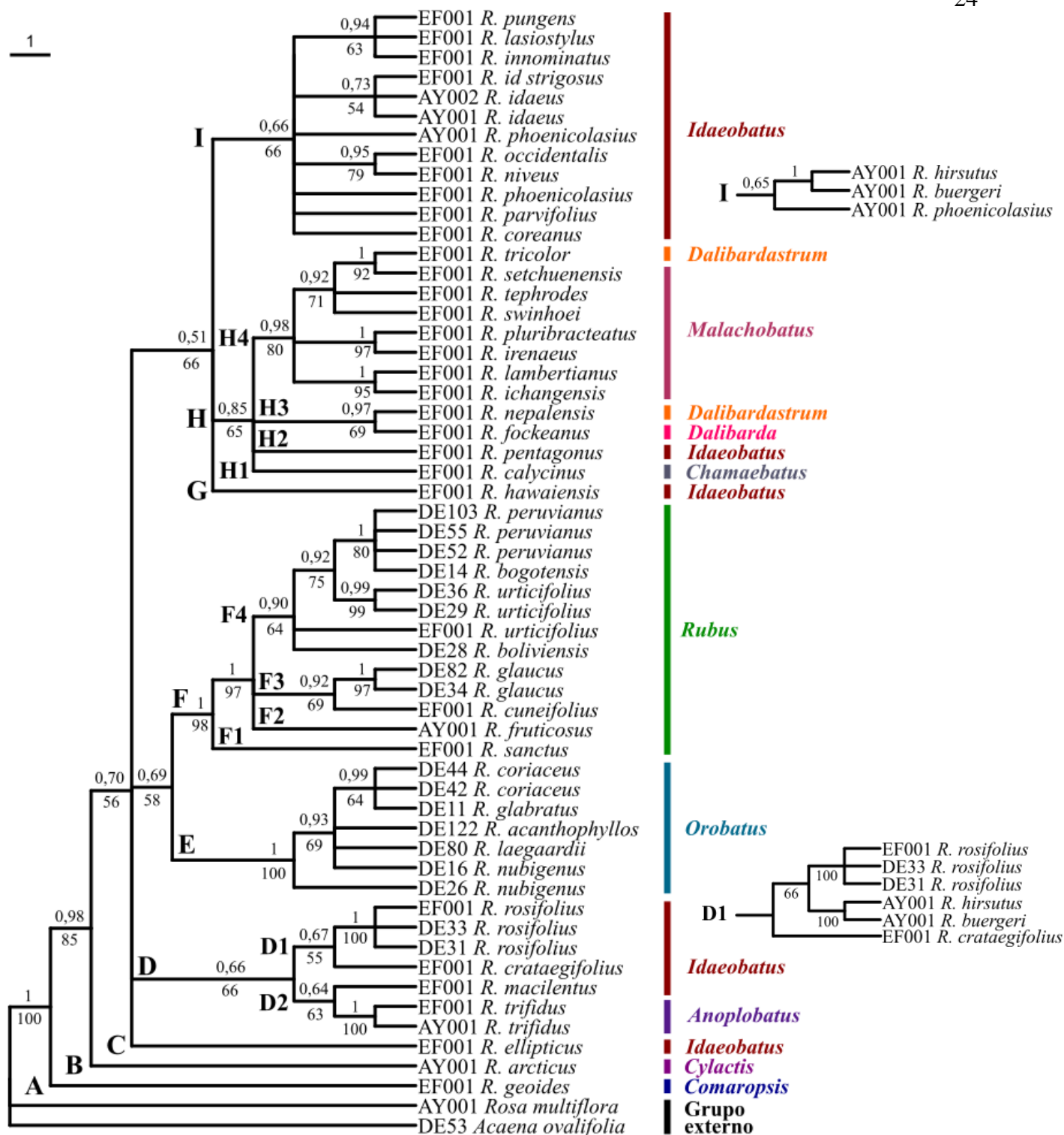
Los árboles filogenéticos de los análisis de ML y BI de la región ITS resultaron similares entre sí (Figura 4). En ambos análisis, se evidenció la monofilia del género *Rubus* con soportes

altos de los valores Bootstrap (BS) en el caso de ML, y de probabilidades posteriores (PP) para BI (100% BS y 1,00 PP). Se recuperaron nueve clados con soportes mayormente altos. El clado A estaba formado por *R. geoides* (*Comaropsis*) como taxón hermano del resto del género. El clado B contenía a *R. arcticus* (*Cylactis*) como taxón hermano del resto de especies restantes del género con soportes altos (85% BS y 0,98 PP). Los clados restantes presentaron soportes bajos (56% BS y 0,70 PP) y carecían de resolución filogenética entre la mayor parte de los clados.

El clado C contenía a *R. ellipticus* (*Idaeobatus*) como una politomía. El clado D agrupó a tres especies del subgénero *Idaeobatus* (*R. rosifolius*, *R. macilentus* y *R. crataegifolius*) y una de *Anoplobatus* (*R. trifidus*) en dos subclados (D1 y D2) con soportes bajos (63% BS y 0,66 PP). Los clados E y F fueron encontrados como taxa hermana entre sí con soportes bajos (58% BS y 0,69 PP). El clado E contenía a las especies del subgénero *Orobatus* con soportes altos (100% BS y 1,00 PP). El clado F estaba conformado por las especies del subgénero *Rubus* en cinco subclados con soportes altos (98% BS y 1,00 PP). Los clados G, H e I se ubicaron como taxa relacionada a los clados C–F con soportes bajos (66% BS y 0,51 PP).

El clado G contenía a *R. hawaiiensis* (*Idaeobatus*) como una politomía con el clado H. El clado H con soportes bajos (65% BS y 0,85 PP) fue dividido en cuatro subclados. Los subclados H1 y H2 se ubicaron como politomías con el subclado H3 y contenían a *R. calycinus* (*Chamaeobatus*) y *R. pentagonus* (*Idaeobatus*), respectivamente. El subclado H3 agrupó a *R. fockeanus* (*Dalibarda*) y *R. nepalensis* (*Dalibardastrum*) con un soporte alto para BI (0,97 PP). El subclado H4 agrupó a las especies del subgénero *Malachobatus* y a *R. tricolor* (*Dalibardastrum*) apoyadas con un soporte alto para BI (0,98 PP) y medio para ML (80% BS). El clado I contenía al resto de especies del subgénero *Idaeobatus* con soportes bajos (66% BS y 0,66 PP).

Las especies *R. hirsutus* (*Idaeobatus*) y *R. buergeri* (*Malachobatus*) se ubicaron como taxa hermana con soportes altos (100% BS y 1,00 PP). Sin embargo, su ubicación en el árbol filogenético fue distinta según el análisis realizado. En ML, ambas especies se encontraron cercanamente relacionadas a *R. rosifolius* en el subclado D1. En BI, las dos especies se encontraron relacionadas a *R. phoenicolasius* en el clado I.



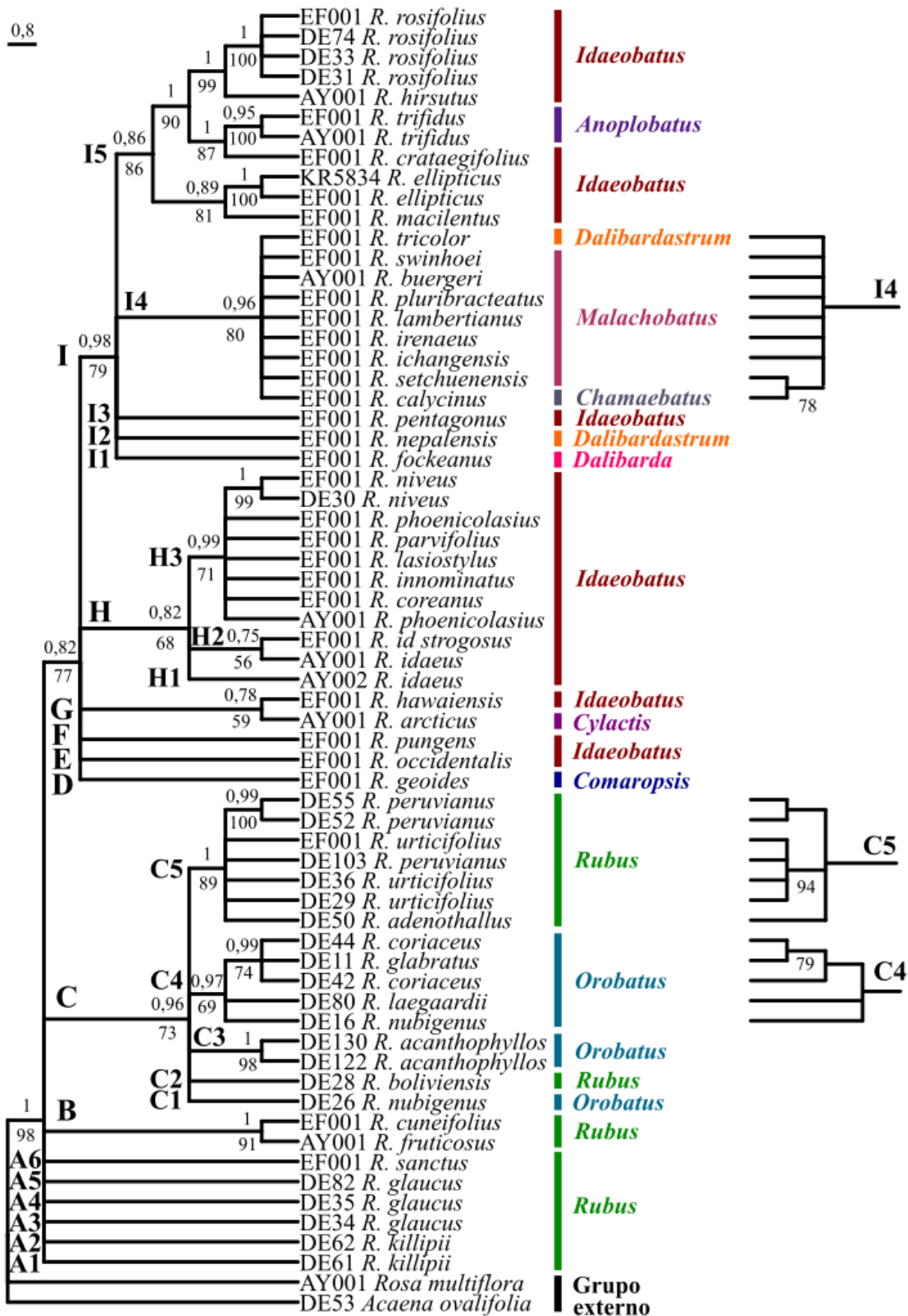
**Figura 4. Filogenia mundial de *Rubus* deducida a partir de la región ITS.** Árbol consenso con la regla de la mayoría del 50%. Los valores de bootstrap y probabilidades posteriores se ubican debajo y sobre las ramas, respectivamente. Las líneas de colores representan a los diferentes subgéneros de *Rubus*.

Las cladogramas a la derecha del árbol muestran la topología del análisis de máxima verosimilitud que no coincidió con la topología del análisis de inferencia bayesiana.

### 5.3.2. REGIÓN TRNL-TRNF

Los árboles filogenéticos de ML y BI fueron similares entre sí (Figura 5). En base a ambos análisis se corroboró la monofilia del género *Rubus* con un soporte alto (98% BS y 1,00 PP) y se distinguieron nueve clados. Las muestras de *R. glaucus* (A3–A5), *R. killipii* (A1–A2) y *R. sanctus* (A6) se ubicaron como politomías al comienzo del árbol. El clado B (91% BS y 1,00 PP) contenía únicamente a *R. fruticosus* y *R. cuneifolius*. El clado C (73% BS y 0,96 PP) agrupó a las especies del subgénero *Orobatus* (C1, C3 y C3) y al resto de las especies del subgénero *Rubus* (C2 y C5) en cinco subclados con soportes altos para BI y soportes altos y medios para ML. El resto de clados surgieron como taxa hermana de la mencionada anteriormente con un soporte medio para ML (77% BS) y bajo para BI (0,82 PP).

Los clados D, E y F contenían a las especies *R. geoides* (*Comaropsis*), *R. occidentalis* (*Idaeobatus*) y *R. pungens* (*Idaeobatus*), respectivamente, como politomías. El clado G contenía a *R. hawaiiensis* (*Idaeobatus*) y *R. arcticus* (*Cylactis*) con soportes bajos (59% BS y 0,78 PP). El clado H agrupó a la mayor parte de las especies del subgénero *Idaeobatus* en tres subclados con soportes bajos (68% BS y 0,82 PP). El clado I (79% BS y 0,98 PP) fue dividido en cinco subclados. Los subclados I1, I2 e I3 contenían a las especies *R. fockeanus* (*Dalibarda*), *R. nepalensis* (*Dalibardastrum*) y *R. pentagonus* (*Idaeobatus*), respectivamente, como politomías. El subclado I4 agrupó a las especies del subgénero *Malachobatus*, *R. calycinus* (*Chamaebatus*) y *R. tricolor* (*Dalibardastrum*) con un soporte alto para BI (0,96 PP) y medio para ML (80% BS). El subclado I5 contenía al resto de especies del subgénero *Idaeobatus* (*R. rosifolius*, *R. hirsutus*, *R. crataegifolius*, *R. ellipticus*, *R. macilentus*) y a *R. trifidus* (*Anoplobatus*) con un soporte alto para ML (86% BS) y bajo para BI (0,86 PP).



**Figura 5. Filogenia mundial de *Rubus* deducida a partir de la región trnL-trnF.** Árbol consenso con la regla de la mayoría del 50%. Los valores de bootstrap y probabilidades posteriores se ubican debajo y sobre las ramas, respectivamente. Las líneas de colores representan a los diferentes subgéneros de *Rubus*.

Las cladogramas a la derecha del árbol muestran la topología del análisis de máxima verosimilitud que no coincidió con la topología del análisis de inferencia bayesiana y corresponden a las especies que están en frente de ellas.

## 5.4. ANÁLISIS DE *RUBUS* DE ECUADOR

### 5.4.1. REGIÓN ITS

Se obtuvo la secuencia de 22 individuos de 12 especies de *Rubus* y el grupo externo *A. ovalifolia*. No se logró obtener la secuencia de 5 muestras, entre ellas *R. niveus*, *R. ellipticus* y *R. adenothallus* (Tabla 2). El tamaño de la región ITS no presentó gran variación; dentro de *Rubus*, la secuencia más corta correspondió a *R. glaucus* y *R. urticifolius*, ambas de 596 bp, y la más larga, a *R. acanthophyllos* con 602 bp. En relación con los grupos externos, *P. argentea* presentaba la secuencia más corta con 593 bp, mientras que *F. chiloensis* y *A. ovalifolia* exhibían secuencias de 597 bp y 598 bp, respectivamente. El tamaño de la matriz final del alineamiento de esta región fue de 616 caracteres de los cuales 112 (18,18 %) resultaron parsimoniosamente informativos. El contenido GC promedio del alineamiento final fue de 56,8% (Tabla 3). En el alineamiento final no se detectaron duplicaciones o deleciones que excedan cuatro pares de bases.

**Tabla 3. Características de las secuencias de ADN.** Tamaño de alineamiento, sitios informativos y modelos evolutivos para el set de datos nacional de *Rubus* con grupos externos (+GE) y sin ellos.

Región	trnL-trnF	trnS-trnG	intrón trnG	cpDNA	ITS
<b>Rubus + GE</b>	28	26	15	29	24
<b>Rubus</b>	25	23	12	26	21
<b>Tamaño del alineamiento de nucleótidos (bp)</b>					
<b>Rubus + GE</b>	499	675	713	1887	616
<b>Rubus</b>	477	593	706	1776	609
<b>Sitios parsimoniosamente informativos</b>					
<b>Rubus + GE</b>	37 (7,41%)	63 (9,33%)	40 (5,61%)	140 (7,42%)	112 (18,18%)
<b>Rubus</b>	25 (5,24%)	34 (5,73%)	28 (3,97%)	87 (4,90%)	59 (9,69%)
<b>Modelos evolutivos</b>	HKY + G	HKY + G	GTR + G	--	GTR + I

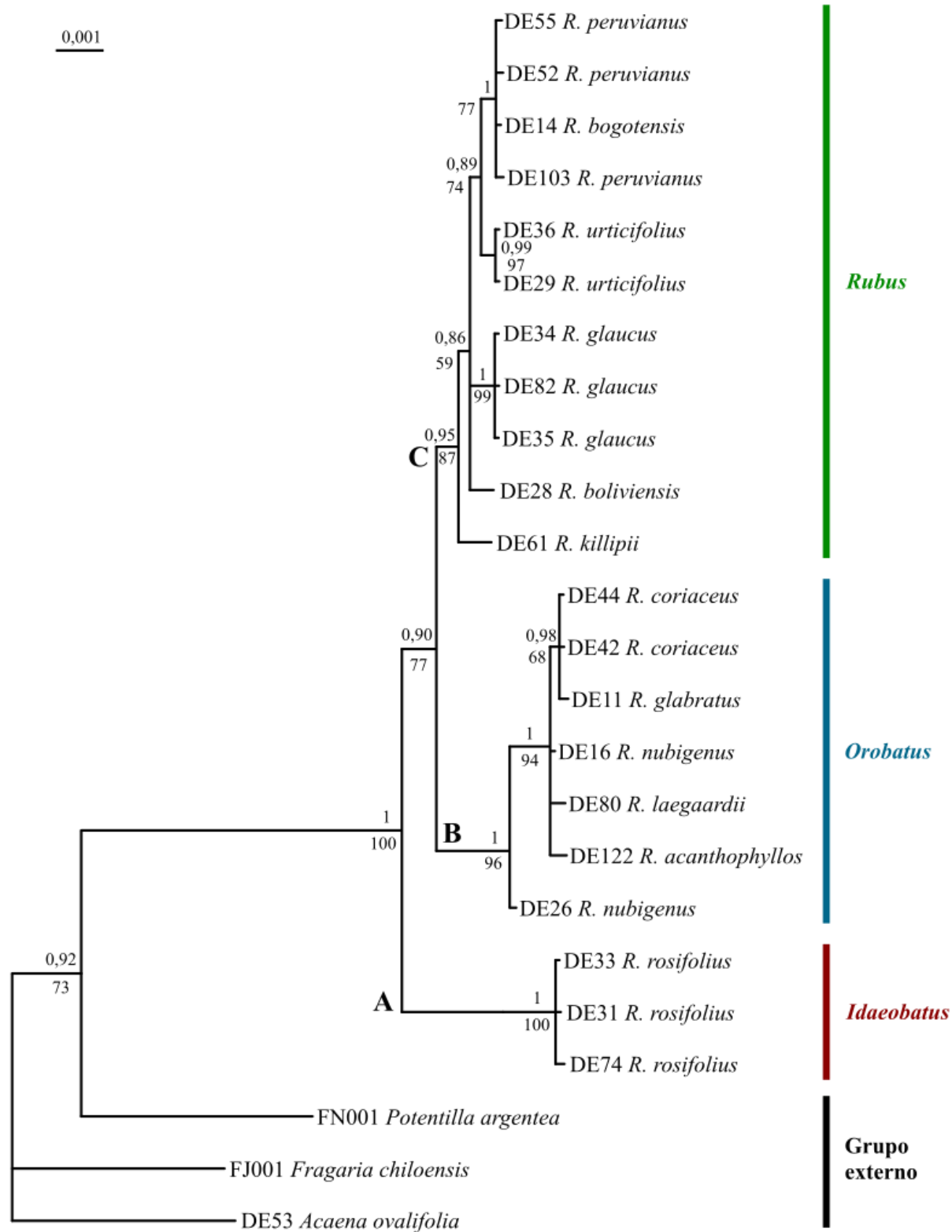
### 5.4.2. INTERPRETACIÓN DE LOS ÁRBOLES NUCLEARES

Los árboles filogenéticos de ML y BI de la región ITS fueron muy similares entre sí (Figura 6) y concordaron con la clasificación infragenérica de *Rubus* para Ecuador (Anexo 1). En ambos casos se comprobó la monofilia del género *Rubus* con soportes altos (100% BS y 1,00 PP) y se observaron tres clados. El clado A contenía a *R. rosifolius* (*Idaeobatus*) con soportes altos (100% BS y 1,00 PP). Los clados B y C se encontraron relacionados entre sí con un soporte medio para ML (77% BS) y bajo para BI (0,90 PP), y a su vez, estos se ubicaron como un grupo relacionado al clado A.

El clado B agrupó a las especies registradas del subgénero *Orobatus* como un grupo monofilético con soportes altos (96% BS y 1,00 PP). Dentro de este clado, la muestra DE26 *R. nubigenus* se constituyó como taxón hermano del resto de especies de este subgénero. Internamente, no existió buena resolución filogenética entre las especies de este clado, únicamente se evidenció a *R. coriaceus* y *R. glabratus* como taxa cercanamente relacionada con un soporte alto para BI (0,98 PP). El clado C contenía a las especies del subgénero *Rubus* como un grupo monofilético con soportes altos (87% BS y 0,95 PP). *Rubus killipii* se ubicó como taxón hermano del resto de especies de este subgénero. Las especies *R. glaucus*, *R. bolviensis* y el complejo *R. peruvianus*, *R. bogotensis* y *R. urticifolius* no presentaron relaciones filogenéticas bien resueltas.

### 5.4.3. REGIÓN TRNL-TRNF

Se obtuvo la secuencia de 26 individuos de 14 especies de *Rubus* y el grupo externo *A. ovalifolia*. No se logró obtener la secuencia de *R. bogotensis* (Tabla 2). El tamaño de la región trnL-trnF presentó variación moderada; dentro de *Rubus*, la secuencia más corta correspondió a *R. peruvianus* (DE52 y DE55) con 441 bp y la más larga, a *R. ellipticus* con 460 bp. En relación con los grupos externos, *A. ovalifolia* presentó la secuencia más corta con 344 bp, mientras que *P. argentea* y *F. chilensis* exhibían secuencias de 438 bp y 461 bp, respectivamente. El tamaño de la matriz final del alineamiento de esta región fue de 499 caracteres de los cuales 37 (7,41 %) resultaron parsimoniosamente informativos (Tabla 3). El contenido GC promedio del alineamiento final fue de 33,7%.



**Figura 6. Filogenia de *Rubus* de Ecuador deducida a partir de la región ITS.** Árbol consenso con la regla de la mayoría del 50%. Los valores de bootstrap y probabilidades posteriores se ubican debajo y sobre las ramas, respectivamente. Las líneas de colores representan a los diferentes subgéneros de *Rubus*.

En el alineamiento final, sin los grupos externos, se observaron dos duplicaciones en dos muestras y dos deleciones en siete muestras. La primera deleción se ubicó desde la posición 24 hasta la 32 del alineamiento y se encontró únicamente en las muestras DE52 y DE55 de *R. peruvianus*. La segunda deleción fue detectada en las especies *R. rosifolius*, *R. niveus* y *R. ellipticus* en la posición 153 con 5 bp ausentes. La primera duplicación de 12 bp en la posición 182 se halló en *R. niveus*; mientras la segunda, de 16 bp en la posición 377 era de *R. ellipticus*.

#### 5.4.4. REGIÓN TRNS-TRNG

Se obtuvo la secuencia de 13 individuos de 7 especies de *Rubus* y el grupo externo *A. ovalifolia*. No se logró obtener la secuencia de varias especies (Tabla 2). El tamaño de la región trnS-trnG presentó una gran variación; dentro de *Rubus*, la secuencia más corta correspondió a *R. coriaceus* con 525 bp y la más larga, a *R. peruvianus* y *R. urticifolius*, ambos, con 588 bp. En relación con los grupos externos, *F. chilensis* presentó la secuencia más larga con 595 bp, mientras que *A. ovalifolia* y *P. argentea* exhibían secuencias de 571 bp y 557 bp, respectivamente. El tamaño de la matriz final del alineamiento de esta región fue de 675 caracteres de los cuales 63 (9.33 %) resultaron parsimoniosamente informativos (Tabla 3). El contenido GC promedio del alineamiento final fue de 33,6%.

En el alineamiento final, sin los grupos externos, se observaron varias deleciones en seis muestras. A partir de la posición 189 hasta la 255 se encontraron deleciones variables desde 41 bp hasta 66 bp en cuatro especies, *R. rosifolius*, *R. killipii*, *R. coriaceus* y *R. glabratus*. Se observaron dos deleciones adicionales en *R. rosifolius*; la primera deleción se ubicó en la posición 83 con cinco bp ausentes; y la segunda, de ocho bp se encontró en la posición 107. La última deleción de nueve bp en la posición 353 fue hallada de *R. killipii*.

#### 5.4.5. INTRÓN TRNG

Se obtuvo la secuencia de 24 individuos de 13 especies de *Rubus* y el grupo externo *A. ovalifolia*. No se logró obtener la secuencia de 3 muestras, incluyendo a las especies *R. acanthophyllos*, *R. ellipticus* y *R. adenothallus* (Tabla 2). El tamaño del intrón trnG no presentó gran variación; dentro de *Rubus*, casi todos los taxa presentaron entre 691 y 692 bp; sin embargo,

*R. rosifolius* presentó la secuencia más larga con 706 bp. En relación con los grupos externos, *P. argentea* presentó la secuencia más corta con 633 bp, mientras que *F. chilensis* y *A. ovalifolia* exhibían secuencias de 973 bp y 679 bp, respectivamente. El tamaño de la matriz final del alineamiento de esta región fue de 713 caracteres de los cuales 40 (5,61%) resultaron parsimoniosamente informativos (Tabla 3). El contenido GC promedio del alineamiento final fue de 31%.

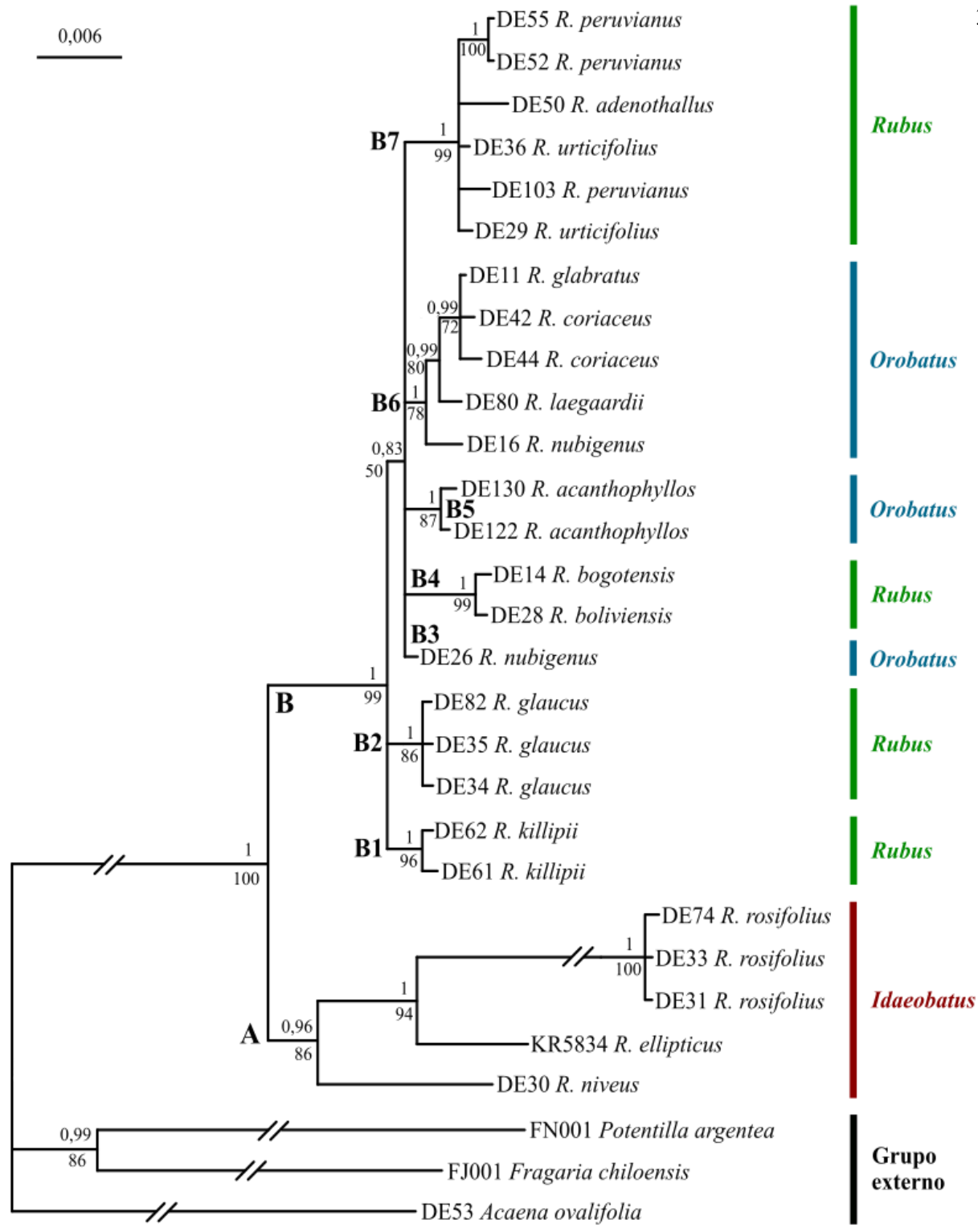
En el alineamiento final, sin los grupos externos, se observaron dos duplicaciones en cuatro muestras. La primera duplicación de 6 bp, en la posición 191, fue encontrada en *R. rosifolius*. La segunda duplicación de 8 bp, en la posición 641, era compartida por *R. rosifolius* y *R. niveus*.

#### 5.4.6. INTERPRETACIÓN DE LOS ÁRBOLES CLOROPLÁSTICOS

El tamaño de la matriz final del alineamiento combinado de los fragmentos de cpDNA (trnL-trnF, trnS-trnG e intrón trnG) fue de 1887 caracteres de los cuales 140 (7,42 %) resultaron parsimoniosamente informativos. El contenido GC promedio del alineamiento final fue de 32,4%.

Los árboles filogenéticos de ML y BI del análisis combinado de los fragmentos de cpDNA fueron muy similares entre sí (Figura 7) y apoyaron, parcialmente, a la clasificación infragenérica de las especies de *Rubus* de Ecuador (Anexo 1). En ambos casos se confirmó la monofilia del género *Rubus* con soportes altos (100% BS y 1.00 PP) y se observaron dos clados. El clado A, con soportes altos (86% BS y 0,96 PP), contenía a tres especies del subgénero *Idaeobatus* (*R. rosifolius*, *R. niveus* y *R. ellipticus*). Dentro de este clado *R. niveus* fue ubicado como taxón hermano de *R. ellipticus* y *R. rosifolius*. Posteriormente, *R. ellipticus* (94% BS y 1,00 PP) se ubicó como taxón hermano de las muestras de *R. rosifolius*, las cuales se agruparon entre sí (100% BS y 1,00 PP).

El clado B agrupó a las especies de *Rubus* de Ecuador (99% BS y 1,00 PP) y fue dividido en siete subclados. Los subclados B1 y B2 contenían a las muestras de *R. killipii* (96% BS y 1,00 PP) y *R. glaucus* (86% BS y 1,00 PP), respectivamente. El clado B3 contenía a la muestra DE26 *R. nubigenus* como una politomía con el subclado B4. Los subclados B4 (*R. boliviensis* y *R. bogotensis*) y B7 (*R. peruvianus*, *R. adenothallus* y *R. urticifolius*) agruparon a las especies restantes del subgénero *Rubus* con soportes altos (99% BS y 1,00 PP). Los subclados B5 y B6



**Figura 7. Filogenia de *Rubus* de Ecuador deducida a partir ADN cloroplástico.** Árbol consenso con la regla de la mayoría del 50% de las regiones trnL-trnF, trnS-trnG e intrón trnG. Los valores de bootstrap y probabilidades posteriores se ubican debajo y sobre las ramas, respectivamente. Las líneas de colores representan a los diferentes subgéneros de *Rubus*.

contenían al resto de las especies del subgénero *Orobatus*. El subclado B5 contenía a *R. acanthophyllos* con soportes altos (87% BS y 1,00 PP). El subclado B6 agrupó al resto de especies del subgénero *Orobatus* con un soporte alto para BI (1,00 PP) y medio para ML (78% BS).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS ESPECIES DE *RUBUS* DEL MUNDO

El análisis filogenético de ambas regiones de ADN corroboró la monofilia del género *Rubus* (Figuras 4 y 5) a nivel mundial, lo cual concuerda con los resultados de otros estudios filogenéticos (Alice y Campbell, 1991; Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b, Yang y Pak, 2006). Aun así, se observaron incongruencias entre los resultados de los árboles nucleares y cloroplásticos y ausencia de resolución filogenética a nivel intraespecífico. El origen mayormente poliploide de las especies de *Rubus* (Vamosi y Dickinson, 2006), además de procesos constantes de hibridación, inclusive entre taxa distantes (Alice, Eriksson, Eriksen y Campbell, 2001; Mimura, Mishima, Lascoux y Yahara, 2014), apomixis y evolución reticulada (Sochor et al., 2015) ocasionan, en muchos casos, los problemas mencionados anteriormente (Cronn y Wendel, 2004; Linder y Rieseberg, 2004; Wang, McAllister, Bartlett y Buggs, 2016a). A esto se adiciona la inclusión de una fracción poco representativa, especialmente, a nivel infragenérico de las especies de *Rubus*, y la posible incorrecta identificación de las muestras descargadas, lo cual pudo haber ocasionado ruido en el análisis filogenético (Pick et al., 2010; Wiens, 2004).

El subgénero *Idaeobatus* se mostró como un grupo polifilético en los árboles nucleares (Figura 4) y cloroplásticos (Figura 5), lo que concuerda con los resultados reportados por otros autores (Alice y Campbell, 1991; Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b, Yang y Pak, 2006). Se pudo apreciar la inclusión de *R. trifidus* (*Anoplobatus*) en ambos árboles. *Anoplobatus* es un subgénero cercano a *Idaeobatus* y ambos subgéneros están mayormente conformados por especies diploides (Hummer, Bassil y Alice, 2015; Thompson, 1995, 1997). Esto sugiere que *R. trifidus* pudo haberse originado a partir de una especie del subgénero *Idaeobatus*. Algunas especies de este subgénero no se encontraron dentro de ninguno de los clados (*R. occidentalis*, *R. hawaiiensis*, *R. pungens* y *R. pentagonus*), probablemente por las relaciones que mantienen con los otros subgéneros.

El subgénero *Malachobatus* se mostró como un grupo monofilético en ambos casos (Figuras 4 y 5), lo cual concuerda con los resultados de Wang et al. (2016b), a pesar de que se

incluyeron más especies de este subgénero en dicho estudio. En el caso del árbol filogenético de la región ITS, *R. buergeri* fue la única especie de *Malachobatus* que se ubicó dentro del clado formado por las especies de *Idaeobatus*. Según la información de Thompson (1995, 1997), *Malachobatus* tiene especies exclusivamente poliploides lo cual podría explicar la poca resolución interespecífica en el árbol cloroplástico (Figura 5). Adicionalmente, el origen poliploide de esta especie podría explicar su ubicación, pues es posible que la última especie materna con la cual hibridizó el antepasado de *R. buergeri* pudo pertenecer al subgénero *Idaeobatus*. En ambas filogenias se apreció a *Malachobatus* como grupo hermano de un clado de *Idaeobatus* y otras especies (*R. pentagonus*, *R. hawaiiensis*) de este subgénero. Tal como lo plantean Wang et al. (2016b), es posible que *R. pentagonus*, o alguna otra especie del subgénero *Idaeobatus*, haya sido el antepasado que pudo haber originado a las especies de *Malachobatus*.

Los subgéneros *Comaropsis* (*R. geoides*), *Cylactis* (*R. arcticus*), *Dalibarda* (*R. fockeanus*), *Dalibardastrum* (*R. nepalensis* y *R. tricolor*) y *Chamaebatus* (*R. calycinus*) mantuvieron distintas ubicaciones en los árboles filogenéticos. *Rubus nepalensis* y *R. fockeanus* no tuvieron una ubicación clara dentro de los árboles filogenéticos, aunque se encontraron cerca del clado de las especies del subgénero *Malachobatus*. Por otro lado, *R. tricolor* y *R. calycinus* se ubicaron dentro de este clado, el cual no tuvo buena resolución filogenética (nrDNA). Las especies mencionadas anteriormente son poliploides (Thompson, 1995, 1997), a excepción de *R. fockeanus* cuyo número cromosómico es desconocido. En el caso de las primeras dos especies (*R. nepalensis* y *R. fockeanus*), es probable que su origen haya ocurrido a partir de un precursor de *Malachobatus*, mientras que las últimas dos (*R. calycinus* y *R. tricolor*) pudieron haberse originado a partir de alguna especie dentro de *Malachobatus*. *Rubus arcticus* y *R. geoides* se establecieron como taxa ancestrales de *Rubus* en el árbol nuclear, pero, en el árbol cloroplástico, *R. geoides* se ubicó como una politomía con los clados E, F, G y H, mientras *R. arcticus* formó un clado (G) con *R. hawaiiensis* (*Idaeobatus*). En el primer caso, al ser una especie tetraploide (Thompson, 1997), el último ancestro materno más reciente de *R. geoides* pudo haber estado relacionado con los precursores de *Idaeobatus*, a diferencia de *R. arcticus*, especie diploide, cuya posición podría ser debido a una posible hibridación con alguna especie de este subgénero.

Los subgéneros *Rubus* y *Orobatus* se constituyeron, cada uno, como un grupo monofilético en el árbol nuclear (Figura 4) y como grupos parafiléticos en el árbol cloroplástico (Figura 5). En el árbol cloroplástico ambos subgéneros se ubicaron como los grupos basales del género *Rubus*. Sin embargo, su ubicación en el árbol nuclear fue poco clara. Tomando en cuenta que las especies utilizadas (*R. cuneifolius*, *R. fruticosus* y *R. urticifolius*) son diploides (Thompson, 1995, 1997), que algunas especies sudamericanas de *Rubus* también lo son (*R. bogotensis*, *R. adenotrichos*, *R. urticifolius* y *R. floribundus*) y en base a su ubicación en los árboles filogenéticos, se puede afirmar una historia evolutiva distinta de estos dos subgéneros en comparación al resto de subgéneros de *Rubus*.

## **6.2. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS ESPECIES ECUATORIANAS DE RUBUS**

### **6.2.1. TRABAJO MOLECULAR**

Se obtuvo las secuencias de 15 de las 22 especies recolectadas (Tabla 1 y 2). El éxito en el proceso de extracción de ADN fue el mayor impedimento dado por los altos niveles de metabolitos secundarios existentes en las hojas de *Rubus* (Ali et al., 2012; Gudej y Tomczyk, 2004), lo cual interfiere en la obtención de ADN (Khanuja, Shasany, Darokar y Kumar, 1999). Aun así, se trabajó con varios especímenes en relación al total de especies de cada subgénero presente en Ecuador (Anexo 1).

### **6.2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

Al igual que en el análisis mundial, el análisis filogenético de las especies ecuatorianas también corroboró la monofilia del género *Rubus* (Figuras 6 y 7) en base a nrDNA y cpDNA, lo cual concuerda con los resultados de algunos estudios filogenéticos (Alice y Campbell, 1991; Sutherland et al., 2008; Wang et al., 2016b, Yang y Pak, 2006). Las tres especies de *Idaeobatus* (*R. rosifolius*, *R. ellipticus* y *R. niveus*) se agruparon en el clado A separándolas del resto de especies de Ecuador. Al ser especies exóticas y poseer una historia evolutiva distinta (Winter et al., 2009) su ubicación en un clado distinto al de las especies ecuatorianas es coherente. Aún más importante, al no encontrarse *Rubus rosifolius* incluida dentro de las especies ecuatorianas se

podría afirmar la inexistencia de eventos de hibridación con las especies ecuatorianas. Por otro lado, al no poseer información de ADN nuclear de *R. ellipticus* y *R. niveus* no se podría afirmar lo mismo en ambas especies.

En base a los resultados de los árboles filogenéticos, la clasificación propuesta por Focke (1910, 1911 y 1914) y Romoleroux (1996) para las especies ecuatorianas se adecuó parcialmente. Las especies dentro de los subgéneros *Orobatus* y *Rubus* fueron clasificadas de esta manera por sus características morfológicas. Las más destacables, *Orobatus* se constituye mayormente de plantas trepadoras y rastreras con estípulas suborbiculares y hojas simples a trifoliales, mientras *Rubus* posee hábito arbustivo, estípulas filiformes o subuladas y hojas trifoliadas a palmaticompuestas pentafoliadas. En base a nrDNA (Figura 6), la clasificación infragenérica morfológica de ambos grupos se ajustó a la información molecular. Sin embargo, esta no logró adecuarse en los árboles de cpDNA (Figura 7), lo cual evidenció incongruencia entre ambos árboles filogenéticos.

El subgénero *Orobatus* resultó un grupo monofilético en el árbol nuclear (clado B) (Figura 7) y un grupo parafilético en el árbol cloroplástico (subclados B3, B5, B6) (Figuras 7), de esta manera se confirmó de manera parcial la clasificación propuesta por Focke (1910, 1911 y 1914) y Romoleroux (1996). Las diferencias entre ambos árboles fueron la presencia de dos subclados formados por la muestra DE26 *R. nubigenus* (B3) y dos especímenes de *R. acanthophyllos* (B5) dentro del clado B del árbol cloroplástico (Figura 7). Según Thompson (1995, 1997) este subgénero está conformado, sobre todo, por especies hexaploides. Basándose en la información proporcionada por Wang et al. (2016b), es probable que el último ancestro materno de *R. acanthophyllos* fuera distinto al del resto de las especies de *Orobatus*. Sin embargo, al formar un grupo monofilético en el árbol nuclear (Figura 6) se podría afirmar que, probablemente, comparten los mismos ancestros comunes, es decir, fueron conformados por la misma, o una muy parecida, combinación de especies.

Según Soltis y Soltis (1999), la generación de una especie a partir de poliploidización es muy frecuente en angiospermas y podría ocurrir de distintas maneras. En el caso de las especies analizadas del subgénero *Orobatus*, si se asume al ancestro común de las especies *R. coriaceus*, *R. glabratus*, *R. laegaardii* y *R. nubigenus* (subclado B6) como resultado de la hibridación de tres

especies hipotéticas, AA, BB y CC, al encontrarse en el mismo clado (B) en el árbol nuclear, *Rubus acanthophyllos* (subclado B5) también poseería ADN de dichas especies, aunque con una conformación distinta. Por ejemplo, el subclado B6 pudo haberse formado a partir de la hibridación inicial de AA (♂) y BB (♀), y la hibridación posterior de AABB (♀) y CC (♂) donde el híbrido final mantendrá el cpDNA de la especie BB. Por otro lado, *R. acanthophyllos* pudo haberse originado a partir de la hibridación de AABB (♂) y CC (♀) donde el cpDNA será de la especie CC, lo cual explicaría su ubicación fuera del subclado B6 que contenía a las especies del subgénero *Orobatus*. Aun así, los eventos de hibridación por los cuales pudo haberse originado el subclado B6 y *R. acanthophyllos* podrían haber sido más complejos (Tabla 4). La ubicación de los subclados B3, B5 y B6 entre subclados que contenían a especies del subgénero *Rubus* podría significar que el último ancestro materno de las especies de *Orobatus* pudo haber sido una especie del subgénero *Rubus*, lo cual aludiría al origen de las especies de este subgénero a partir de la hibridación de al menos una especie del subgénero *Rubus*.

**Tabla 4. Posibles eventos de hibridación.** Posibles combinaciones que pudieron haber originado a un clado hexaploide a partir de 3 especies hipotéticas AA, BB y CC.

1er evento de hibridación	cpDNA final	2do evento de hibridación	nrDNA final	cpDNA final
AA (♀) X BB (♂)	AA	AABB (♀) X CC (♂)	AABBCC	AA
AA (♀) X BB (♂)	AA	AABB (♂) X CC (♀)	AABBCC	CC
AA (♂) X BB (♀)	BB	AABB (♀) X CC (♂)	AABBCC	BB
AA (♂) X BB (♀)	BB	AABB (♂) X CC (♀)	AABBCC	CC
AA (♀) X CC (♂)	AA	AACC (♀) X BB (♂)	AABBCC	AA
AA (♀) X CC (♂)	AA	AACC (♂) X BB (♀)	AABBCC	BB
AA (♂) X CC (♀)	CC	AACC (♀) X BB (♂)	AABBCC	CC
AA (♂) X CC (♀)	CC	AACC (♂) X BB (♀)	AABBCC	BB
BB (♀) X CC (♂)	BB	BBCC (♀) X AA (♂)	AABBCC	BB
BB (♀) X CC (♂)	BB	BBCC (♂) X AA (♀)	AABBCC	AA
BB (♂) X CC (♀)	CC	BBCC (♀) X AA (♂)	AABBCC	CC
BB (♂) X CC (♀)	CC	BBCC (♂) X AA (♀)	AABBCC	AA

El subgénero *Rubus*, al igual que en el análisis mundial, se constituyó como un grupo monofilético en el árbol nuclear (clado C) (Figura 6), pero como un grupo parafilético en el árbol cloroplástico (subclados B1, B2, B4 y B7) (Figura 7). Inicialmente se apreció a *R. killipii* y *R. glaucus* como especies basales de este subgénero y como politomías en el árbol cloroplástico. Se conoce que *R. glaucus* es una especie tetraploide, con posible origen a partir de la hibridación de una especie de *Rubus* y una de *Idaeobatus* (Thompson, 1997). Sin embargo, la presencia de esta especie, únicamente, en el clado *Rubus*, en todos los árboles filogenéticos analizados, sugeriría su posible origen a partir de la hibridación de dos especies del subgénero *Rubus*. Por otro lado, se tiene información limitada de *R. killipii*, se ha observado que su hábito es de liana a diferencia del resto de *Rubus* ecuatorianos y no se conoce nada acerca de su fruto (Romoleroux, 1996) por lo cual es casi imposible realizar alguna conjetura de su relación con el resto de las especies ecuatorianas de *Rubus*. Dentro del resto de las especies del subgénero *Rubus* se aprecia un clado definido y altamente soportado formado por *R. peruvianus*, *R. adenothallus* y *R. urticifolius*; mientras *R. boliviensis* y *R. bogotensis*, en el árbol cloroplástico, formaron un grupo hermano, pero también una politomía cercanamente relacionada a las especies mencionadas anteriormente. La falta de resolución de las últimas dos especies pudo deberse a su relación con *R. acanthophyllos* y a la muestra DE26 *R. nubigenus*.

Un caso peculiar, en este estudio, fue la muestra DE26 identificada como *Rubus* cf. *nubigenus*. Filogenéticamente, esta muestra se ubicó como taxón ancestral de las especies del subgénero *Orobatus* en el clado de B (Figura 6); aunque, se mostró como una politomía en el clado B del árbol cloroplástico más emparentada con *Rubus* (Figura 7). Al igual que con el resto de las especies de *Rubus*, la incongruencia observada pudo haberse ocasionado por eventos de hibridación. Curiosamente, esta muestra no presentó la morfología típica de *R. nubigenus*. La estípula no fue suborbiculada (*Orobatus*) (Figura 1) pero tampoco resultó una estípula subulada típica (*Rubus*) (Figura 2). Lamentablemente, la muestra recolectada era juvenil por lo cual no hay información de sus caracteres reproductivos. Aun así, en base a la evidencia molecular y a la morfológica, es probable que este espécimen se trate de un híbrido entre *Orobatus* y *Rubus* o de una especie críptica.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los análisis moleculares mundiales confirmaron la monofilia del género *Rubus* conformado por las especies de 10 de los 14 subgéneros utilizados. Los subgéneros *Malachobatus*, *Rubus*, *Orobatus* concordaron, parcialmente con la clasificación propuesta por Focke en base a la información del nrDNA, mientras *Idaeobatus* no lo hizo y el resto de los subgéneros contenían muy pocas muestras. Internamente, existió una tendencia a una baja resolución filogenética interespecífica, especialmente en los árboles de cpDNA, probablemente, por el origen híbrido de muchas especies. Los clados ecuatorianos, en conjunto con tres especies, dos europeas y otra norteamericana, se ubicaron como clados distintos del resto de los subgéneros de *Rubus*, posiblemente por una historia evolutiva distinta al del resto de especies.

La distribución de los taxa ecuatorianos en los distintos subgéneros de *Rubus* concuerda, parcialmente, con los resultados filogenéticos obtenidos (nrDNA). Las diferencias podrían explicarse por una distinta historia evolutiva por hibridación que por diferencias morfológicas conspicuas. Es necesario complementar la información generada adicionando la mayor cantidad posible de especies sudamericanas; y realizar estudios citológicos, morfométricos y de parentesco (nrDNA) de todas las muestras con el fin de comprender de mejor manera los eventos de evolución del género *Rubus* en Sudamérica, lo cual permitirá entender cómo logró su especialización en distintos continentes, especialmente donde no existen especies diploides.

La mayor parte de las regiones utilizadas, durante este estudio, resultaron ser efectivas durante la amplificación, secuenciamiento automático y los análisis moleculares. De todas maneras, se recomienda utilizar regiones de ADN que no posean una cola poli-A larga para evitar errores de amplificación y secuenciamiento. También, se recomienda utilizar más regiones cloroplásticas y nucleares, o el genoma completo, para proporcionar más información de este grupo tan complejo de plantas, especialmente, de regiones de nrDNA que permitan dilucidar el origen de las especies poliploides. Finalmente, se recomienda realizar la extracción de ADN de *Rubus* con kits especializados en plantas con una gran cantidad de metabolitos secundarios para reducir el tiempo invertido en este proceso y optimizarlo en otros métodos de la investigación.

## 8. REFERENCIAS

- Ali, L., Alsanius, B. W., Rosberg, A. K., Svensson, B., Nielsen, T. y Olsson, M. E. (2012). Effects of nutrition strategy on the levels of nutrients and bioactive compounds in blackberries. *European Food Research and Technology*, 234(1), 33–44.
- Alice, L. A. y Campbell, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86(1), 81–97.
- Alice, L. A., Eriksson, T., Eriksen, B. y Campbell, C. S. (2001). Hybridization and gene flow between distantly related species of *Rubus* (Rosaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Systematic botany*, 769–778.
- Azahuanche, F. R. P., Hurtado, J. D. C. G., Rubio, Z. M. O., Ávalos, F. R. y Aponte, G. L. (2015). Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad hipoglucemiante de *Rubus floribundus* Kunth (Rosaceae) “zarzamora”. *ARNALDOA*, 21(2), 391–402.
- Baldwin, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1(1), 3–16.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. y Donoghue, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri botanical garden*, 247–277.
- Bean, A. R. (1997). A revision of *Rubus* subg. *Malachobatus* (Focke) Focke and *Rubus* subg. *Diemenicus* AR Bean (Rosaceae) in Australia. *Austrobaileya*, 39–51.
- Blackmon, H. y Adams, R. H. (2015). evobiR: Comparative and Population Genetic Analyses. R package version 1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=evobiR>.
- Cronn, R. y Wendel, J. F. (2004). Cryptic trysts, genomic mergers, and plant speciation. *New Phytologist*, 161(1), 133–142.
- Crops (base de datos en línea). Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (fecha de consulta: 16 de noviembre de 2018).
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J. y Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la

Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.

- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C. y Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1307–1313.
- Dennell, R. W. (1976). The economic importance of plant resources represented on archaeological sites. *Journal of Archaeological Science*, 3(3), 229–247.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Boudehri, K., Renaud, C., Capdeville, G., Tauzin, Y., Laigret, F. y Moing, A. (2006). Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit. *Tree Genetics y Genomes*, 3(1), 1–13.
- Edgar, R. C. (2004a). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–1797.
- Edgar, R. C. (2004b). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, 5(1), 113.
- Feng, T., Moore, M. J. yan, M. H., Sun, Y. X., Zhang, H. J., Meng, A. P., Li, X. D., Jiaun, S. G., Li, J. Q. y Wang, H. C. (2017). Phylogenetic study of the tribe Potentilleae (Rosaceae), with further insight into the disintegration of *Sibbaldia*. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(3), 177–191.
- Focke, W. O. (1910). *Species Ruborum, Monographiae generis Rubi prodromus part I*. New York, NY: Stuttgart, E. Schweizerbart, pp. 1–120.
- Focke, W. O. (1911). *Species Ruborum, Monographiae generis Rubi prodromus part II*. New York, NY: Stuttgart, E. Schweizerbart, pp.120–223.
- Focke, W. O. (1914). *Species Ruborum, Monographiae generis Rubi prodromus part III*. New York, NY: Stuttgart, E. Schweizerbart, pp. 224–498.
- Garzón, G. A., Riedl, K. M. y Schwartz, S. J. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.). *Journal of food science*, 74(3), C227–C232.
- Gudej, J. y Tomczyk, M. (2004). Determination of Flavonoids, Tannins and Ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Archives of pharmacal research*, 27(11), 1114–1119.

- Hastings, W. K. (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57, 97–109.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. y Vinh, L. S. (2017). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular biology and evolution*, 35(2), 518–522.
- Hummer, K. E. y Janick, J. (2009). Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In *Genetics and genomics of Rosaceae*. En: Folta, K. M. y Gardiner, S. (Eds) *Genetics and Genomics of Rosaceae* (pp. 1–17). vol 6. New York, NY: Springer.
- Hummer, K. E., Bassil, N. V. y Alice, L. A. (2015). *Rubus* ploidy assessment. *Acta Hort.* 1133, In *XI International Rubus and Ribes Symposium*, pp. 81–88.
- Hutchinson, J. (1964). *The genera of flowering plants vol. 1, Dicotyledons*. Oxford, UK: Clarendon Press.
- Jarvis, C. E. (1992). Seventy-two proposals for the conservation of types of selected Linnaean generic names, the report of Subcommittee 3C on the lectotypification of Linnaean generic names. *Taxon*, 552–583.
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P. y Donoghue, M. (2016). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach* (pp. 379–385). 4<sup>ta</sup> edición. Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc.
- Kalkman, C. (1987). The genus *Rubus* (Rosaceae) in Malesia: 3. The subgenus *Micranthobatus*. *Blumea*, 32(2), 323–341.
- Kalkman, C. (2004). *Rosaceae*. En: Kubitzki K. (Ed.) *The families and genera of vascular plants vol. 6, Flowering plants – Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales* (pp. 343–389). Berlin, Germany: Springer.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., von Haeseler, A. y Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14(6), 587.
- Karst, A. L. y Turner, N. J. (2011). Local ecological knowledge and importance of bakeapple (*Rubus chamaemorus* L.) in a southeast Labrador Métis Community. *Ethnobiology Letters*, 2, 6–18.
- Khanuja, S. P., Shasany, A. K., Darokar, M. P. y Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(1), 74–74.

- Kress, W. J. y Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS one*, 2(6), e508.
- Lemey, P., Salemi, M. y Vandamme A. M. (2009). *The Phylogenetic Handbook. A practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. 2<sup>da</sup> edición. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Linder, C. R. y Rieseberg, L. H. (2004). Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *American journal of botany*, 91(10), 1700–1708.
- Lingdi, L. y Boufford, D. (2003). 28. RUBUS Linnaeus, Sp. P1.1:492.1753 in: Wu, Z., Raven, P. y Hong, D. (Eds). *Flora of China*, vol. 9 (pp. 195–285). Beijing and St. Louis: Science Press and Missouri Botanical Garden Press.
- Lingdi, L., Guizhi, G., Chaoluan L., Alexander, C., Bartholomew, B., Brach, A., Boufford, D., Ikeda, H., Ohba, H., Robertson, K. R. y Spongberg, S. (2003). Rosaceae in: Wu, Z., Raven, P. y Hong, D. (Eds). *Flora of China*, vol. 9 (pp. 46–434). Beijing and St. Louis: Science Press and Missouri Botanical Garden Press.
- Marulanda, M. L., López, A. M. y Aguilar, S. B. (2007). Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7(3).
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller A. H. y Teller, E. (1953). Equations of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.*, 21, 1087–1091.
- Mimura, M., Mishima, M., Lascoux, M. y Yahara, T. (2014). Range shift and introgression of the rear and leading populations in two ecologically distinct *Rubus* species. *BMC evolutionary biology*, 14(1), 209.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B. y Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 519–525.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J. y Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Botany*, 84(3), 335–341.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. y Minh, B. Q. (2014). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268–274.
- Pick, K. S., Philippe, H., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Jackson, D. J., Wrede, P., Wiens, M., Alié, A., Morgenstern, B., Manuel, M. y Wörheide, G. (2010). Improved phylogenomic taxon

- sampling noticeably affects nonbilaterian relationships. *Molecular biology and evolution*, 27(9), 1983–1987.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., Kerr, M., Robertson, K. R., Arsenault, M., Dickinson, T. A. y Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant systematics and evolution*, 266(1–2), 5–43.
- R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Romoleroux, K. (1996). Rosaceae. In: Harling, G. y Andersson, L. (Eds). *Flora of Ecuador*, vol. 56 (pp. 1–70). Göteborg, Stockholm and Quito: University of Gothenburg, Riksmuseum and Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Romoleroux, K. (2011). Rosaceae. In: León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa-Ulloa, C. y Navarrete, H. (Eds). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (pp. 748–750). 2<sup>da</sup> edición. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- RStudio Team. (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Schulze-Menz, G. K. (1964) Rosaceae. In: Melchior H. (Ed.) *Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien II* (pp. 209–218), 12<sup>th</sup> edición. Gebruder Borntraeger, Berlin, Germany.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E. y Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American journal of botany*, 92(1), 142–166.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E. y Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American journal of botany*, 94(3), 275–288.
- Shul'yaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A. M., Lewers, K., Brown, S. K., Davis, T. M., Gardiner, S. E. Potter, D. y Lewers, K. (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant physiology*, 147(3), 985–1003.

- Sochor, M., Vašut, R. J., Sharbel, T. F. y Trávníček, B. (2015). How just a few makes a lot: speciation via reticulation and apomixis on example of European brambles (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 89, 13–27.
- Soltis, D. E. y Soltis, P. S. (1999). Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology y Evolution*, 14(9), 348–352.
- Sutherland, B. L., Alice, L. A. y Dodson, T. M. (2008). Diversity and Relationships of Bhutanese *Rubus*. In *IX International Rubus and Ribes Symposium, Acta horticulturae 777*, pp. 63–70.
- Takhtajan, A. (1997). *Diversity and classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, USA.
- Thermo Fisher Scientific. (2010). NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3.8 User's Manual. Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>.
- Thompson, M. M. (1995). Chromosome numbers of *Rubus* species at the national clonal germplasm repository. *HortScience*, 30(7), 1447–1452.
- Thompson, M. M. (1997). Survey of chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 128–164.
- Value of Agricultural Production (base de datos en línea). Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV> (fecha de consulta: 16 de noviembre de 2018).
- Vamosi, J. C. y Dickinson, T. A. (2006). Polyploidy and diversification: a phylogenetic investigation in Rosaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 167(2), 349–358.
- Wang, N., McAllister, H. A., Bartlett, P. R. y Buggs, R. J. (2016a). Molecular phylogeny and genome size evolution of the genus *Betula* (Betulaceae). *Annals of botany*, 117(6), 1023–1035.
- Wang, Y., Chen, Q., Chen, T., Tang, H., Liu, L. y Wang, X. (2016b). Phylogenetic insights into Chinese *Rubus* (Rosaceae) from multiple chloroplast and nuclear DNAs. *Frontiers in plant science*, 7, 968.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. y Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M., Gaelfand, D., Sninsky, J. y White, T. (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp.315–322). Academic Press, San Diego, USA.

- Wiens, J. J. (2004). The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic biology*, 53(4), 653–661.
- Winter, M., Schweiger, O., Klotz, S., Nentwig, W., Andriopoulos, P., Arianoutsou, M., Basnou, C., Delipetrou, P., Didziulis, V., Hejda, M., Hulme P. E., Lambdon, P. W., Pergl, J., Pysek, P., Roy, D. B. y Kühn, I. (2009). Plant extinctions and introductions lead to phylogenetic and taxonomic homogenization of the European flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21721–21725.
- Yang, J. Y. y Pak, J. H. (2006). Phylogeny of Korean *Rubus* (Rosaceae) based on ITS (nrDNA) and trnL/F intergenic region (cpDNA). *Journal of Plant Biology*, 49(1), 44–54.
- Yang, J., Yoon, H. S. y Pak, J. H. (2012). Phylogeny of Korean *Rubus* (Rosaceae) based on the second intron of the LEAFY gene. *Canadian journal of plant science*, 92(3), 461–472.
- Yu, G. (2018). treeio: Base Classes and Functions for Phylogenetic Tree Input and Output. R package version 1.4.3. <https://guangchuangyu.github.io/software/treeio>.
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y. y Lam, T. T. Y. (2017). ggtree: An R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28–36.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Clasificación infragenérica de las especies de *Rubus* de Ecuador en base a la clasificación taxonómica de Focke (1910, 1911, 1914) y Romoleroux (1996).

Subgénero	Especies	Características morfológicas generales
<i>Orobatus</i>	<i>R. acanthophyllos</i> Focke	Frutos caen con el receptáculo; estípulas suborbiculares; hojas simples a trifoliales; nativa de Sudamérica.
	<i>R. azuayensis</i> Romol.†	
	<i>R. compactus</i> Benth.	
	<i>R. coriaceus</i> Poir.	
	<i>R. glabratus</i> Kunth	
	<i>R. laegaardii</i> Romol.†	
	<i>R. loxensis</i> Benth.	
	<i>R. nubigenus</i> Kunth	
<i>R. roseus</i> Poir.		
<i>Rubus</i>	<i>R. adenothallus</i> Focke	Frutos caen con el receptáculo; estípulas filiformes y subuladas; hojas trifoliadas a palmaticompuestas, pentafoliadas; nativa de Europa y América.
	<i>R. adenotrichos</i> Schldl.	
	<i>R. bogotensis</i> Kunth	
	<i>R. boliviensis</i> Focke	
	<i>R. floribundus</i> Kunth	
	<i>R. glaucus</i> Benth.†	
	<i>R. killipii</i> A. Berger†	
	<i>R. megalococcus</i> Focke	
	<i>R. peruvianus</i> Fritsch	
<i>R. ulmifolius</i> Schott*		
<i>R. urticifolius</i> Poir.		
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. ellipticus</i> Sm.*	Frutos caen sin el receptáculo; estípulas lineares a subuladas; hojas trifoliadas a imparipinnadas, heptafoliados; nativa de Asia y Oceanía
	<i>R. niveus</i> Thunb.*	
	<i>R. rosifolius</i> Sm.*	

\*Especies introducidas a Ecuador

†Especies clasificadas dentro de estos subgéneros por Romoleroux, 1996.

**Anexo 2. Regiones de ADN utilizadas para el análisis filogenético.** Características de las regiones de ADN utilizadas con sus respectivos cebadores, secuencias y temperatura de hibridación (TA).

Región	Tipo ADN	Cebador	Secuencia (5'-3')	Fuente	TA
trnS <sup>GCU</sup> -trnG <sup>UUC</sup>	Cloroplástico	trnS <sup>GCU</sup> *	AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	Shaw et al., 2005	54 °C
		5'trnG2S	TTTTACCACTAAACTATAACCCGC	Shaw et al., 2005	
intrón trnG <sup>UUC</sup>	Cloroplástico	3'trnG <sup>UUC</sup> *	GAATCGCCGCATCGTTAG	Shaw et al., 2005	54 °C
		5'trnG2G	GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAA	Shaw et al., 2005	
trnL <sup>UAA</sup> -trnF <sup>GAA</sup>	Cloroplástico	trnF <sup>GAA</sup> (TabF)	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Shaw et al., 2005	50 °C
		3'trnL <sup>UAA</sup> F(TabE)	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Shaw et al., 2005	
ITS	Nuclear	ITS-1b	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Yang y Pak 2006	54 °C
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990	
rbcL	Cloroplástico	rbcLa-R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	Wang et al., 2016b	50 °C
		rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Wang et al., 2016b	
trnH <sup>GUG</sup> -psbA	Cloroplástico	trnH <sup>GUG</sup>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Shaw et al., 2005	50 °C
		psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Shaw et al., 2005	

### Anexo 3. Información de las secuencias extraídas del GenBank.

Subgénero	Especie	ITS	trnL–trnF	Nueva nomenclatura*
<i>Anoplobatus</i>	<i>R. trifidus</i>	AY818221	AY818243	AY001_R_trifidus
<i>Anoplobatus</i>	<i>R. trifidus</i>	AF055737	EF055356	EF001_R_trifidus
<i>Chamaebatus</i>	<i>R. calycinus</i>	EF034122	EF055310	EF001_R_calycinus
<i>Comaropsis</i>	<i>R. geoides</i>	EF034126	EF055317	EF001_R_geoides
<i>Cylactis</i>	<i>R. arcticus</i>	AY818215	AY818244	AY001_R_arcticus
<i>Dalibarda</i>	<i>R. fockeanus</i>	EF034125	EF055316	EF001_R_fockeanus
<i>Dalibardastrum</i>	<i>R. nepalensis</i>	AF055752	EF055330	EF001_R_nepalensis
<i>Dalibardastrum</i>	<i>R. tricolor</i>	AF055753	EF055355	EF001_R_tricolor
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. coreanus</i>	EF034123	EF055312	EF001_R_coreanus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. crataegifolius</i>	AF055754	EF055313	EF001_R_crataegifolius
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. ellipticus</i>	EF034124	EF055315	EF001_R_ellipticus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. hawaiiensis</i>	AF055762	EF055318	EF001_R_hawaiiensis
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. hirsutus</i>	AY818208	AY818230	AY001_R_hirsutus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. idaeus</i>	AY818217	AY818240	AY001_R_idaeus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. idaeus</i>	AY818198	AY837721	AY002_R_idaeus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. idaeus</i> subsp. <i>strigosus</i>	AF055755	EF055349	EF001 <i>R. id strigosus</i>
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. innominatus</i>	EF034130	EF055322	EF001_R_innominatus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. lasiostylus</i>	EF034134	EF055326	EF001_R_lasiosylus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. macilentus</i>	EF034136	EF055328	EF001_R_macilentus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. niveus</i>	EF034137	EF055332	EF001_R_niveus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. occidentalis</i>	AF055758	EF055333	EF001_R_occidentalis
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. parvifolius</i>	AY083364	EF055336	EF001_R_parvifolius
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. pentagonus</i>	EF034139	EF055339	EF001_R_pentagonus
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. phoenicolasius</i>	AY818197	AY818248	AY001_R_phoenicolasius
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. phoenicolasius</i>	AF055759	EF055340	EF001_R_phoenicolasius
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. pungens</i>	EF034140	EF055341	EF001_R_pungens
<i>Idaeobatus</i>	<i>R. rosifolius</i>	AF055760	EF055342	EF001_R_rosifolius
<i>Malachobatus</i>	<i>R. buergeri</i>	AY818212	AY818245	AY001_R_buergeri
<i>Malachobatus</i>	<i>R. ichangensis</i>	EF034128	EF055320	EF001_R_ichangensis
<i>Malachobatus</i>	<i>R. irenaeus</i>	EF034131	EF055323	EF001_R_irenaeus
<i>Malachobatus</i>	<i>R. lambertianus</i>	EF034132	EF055324	EF001_R_lambertianus
<i>Malachobatus</i>	<i>R. pluribracteatus</i>	AY083368	EF055329	EF001_R_pluribracteatus
<i>Malachobatus</i>	<i>R. setchuenensis</i>	EF034142	EF055346	EF001_R_setchuenensis
<i>Malachobatus</i>	<i>R. swinhoei</i>	EF034143	EF055350	EF001_R_swinhoei
<i>Malachobatus</i>	<i>R. tephrodes</i>	EF034144	EF055351	EF001_R_tephrodes

**Anexo 3. Información de las secuencias extraídas del GenBank. (Continuación).** Códigos de acceso de 39 muestras para las regiones ITS y trnL–trnF, con la nueva nomenclatura utilizada en los análisis de *Rubus* a nivel mundial.

<b>Subgénero</b>	<b>Especie</b>	<b>ITS</b>	<b>trnL–trnF</b>	<b>Nueva nomenclatura*</b>
<i>Rubus</i>	<i>R. cuneifolius</i>	AF055778	EF055314	EF001_R_cuneifolius
<i>Rubus</i>	<i>R. fruticosus</i>	AY818214	AY818246	AY001_R_fruticosus
<i>Rubus</i>	<i>R. sanctus</i>	AF055785	EF055343	EF001_R_sanctus
<i>Rubus</i>	<i>R. urticifolius</i>	AY083374	EF055357	EF001_R_urticifolius
	<i>Rosa multiflora</i>	AB038451	AY818237	AY001_Ro_multiflora

\*Los enunciados de nueva nomenclatura que empiezan con AY corresponden a las muestras utilizadas por Yang y Pak (2006); las muestras que empiezan con EF corresponden a las muestras utilizadas por Sutherland, Alice y Dodson (2008).