



**Caracterización molecular del portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa
“Agroinnovación S.A.” mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia
marcada (STMS).**

Recalde Paredes, Mishell Carolina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

17 de junio del 2022

COPYLEAKS

MRecalde tesis.txt

Scanned on: 16:50 June 25, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	114
Words with Minor Changes	12
Paraphrased Words	36
Omitted Words	0



FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: "Caracterización molecular del portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa "Agroinnovación S.A." mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS)" fue realizado por la señorita **Recalde Paredes, Mishell Carolina**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de junio de 2022



Firma digitalizada por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOE

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias De la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, Recalde Paredes, Mishell Carolina; con CC. 1720740859, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Caracterización molecular del portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa "Agroinnovación S.A." mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS)"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de junio de 2022

Recalde Paredes, Mishell Carolina

C.C: 1720740859



Departamento de Ciencias De la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Recalde Paredes, Mishell Carolina; con CC. 1720740859, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización molecular del portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa “Agroinnovación S.A.” mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 28 de junio de 2022

Recalde Paredes, Mishell Carolina

C.C: 1720740859

Dedicatoria

A Dios por llenarme de bendiciones todos los días, por permitirme vivir y culminar una de las mejores etapas de mi vida rodeada de una excelente familia y de los mejores amigos.

A mi familia por ser los principales promotores de mis sueños, este trabajo es reflejo de su amor y apoyo incondicional, mis logros siempre serán por y para ustedes.

A mi padre Edgar por siempre inculcarme los mejores valores y enseñanzas, que todo lo que se hace por el camino del bien te trae grandes recompensas.

A mi madre Susana por su amor, dulzura y bondad infinita, es mi ser de luz más grande que siempre me llena con su sabiduría.

A mis hermanas Sara y Melissa por ser mi ejemplo a seguir más grande de mujeres fuertes y empoderadas, por demostrarme que todo se puede conseguir con esfuerzo y trabajo duro.

Y finalmente a mi abuelita Carmen por siempre creer en mí, en mis capacidades y alentarme con mucho amor todos los días.

Mishell Carolina Recalde Paredes

Agradecimiento

A mis Padres gracias por sus sacrificios y esfuerzos, por nunca dejar que nos falte nada, que dicha me da decirles lo lograron, todas sus hijas son profesionales.

A toda mi familia por apoyarme siempre, por enseñarme a no rendirme y ser un ejemplo e inspiración, en especial a mi madre Susana por velar por mí en cada madrugada y estar conmigo en momentos difíciles, gracias por todo tu apoyo y amor, no hay palabras en este mundo para agradecerte por tanto mamá.

A mi otra familia Isabel, Andrea y Juan Pablo, gracias por acogerme y hacerme sentir de su familia desde pequeña, ustedes me dan felicidad total y son una parte muy importante en mi etapa de crecimiento personal y profesional. En especial a mi pequeña Andre, gracias por caminar a mi lado y ser mi compañera de risas, a quien siempre le desearé lo mejor de este mundo y para quien espero ser un ejemplo a seguir, que esta meta cumplida sea una muestra de que con esfuerzo y constancia todo se puede.

A mis amigos Mirla, Nash, Mario, y Andrés, la familia que uno elige, que desde el primer día hicieron de la Universidad mi lugar feliz, son de las mejores personas que la vida me pudo regalar, gracias a ustedes reí un poco más fuerte, lloré un poco menos y sonreí mucho más, espero tenerlos siempre en mi vida.

A Helen, Ali, Cami y Chris, que dicha haberles conocido y compartido esta etapa tan importante con ustedes, mi vida universitaria no hubiera sido igual sin ustedes, espero que sigamos viviendo muchas experiencias más juntos y estar siempre en los logros de todos.

A Bryan una persona muy especial que me acompañó en este camino, gracias por todos tus consejos y ayuda, por las palabras de aliento y no permitir que nunca

decaiga, gracias por enseñarme que hay tiempo para todo y que mientras se aprende se disfruta de la etapa.

A Johanna Montenegro por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de titulación, por creer en mis capacidades y ser una excelente persona. Gracias por todas las enseñanzas, eres una inspiración y un ejemplo a seguir.

A la empresa Agroinnovación S.A, por abrirme sus puertas, financiar el proyecto y permitirme ampliar mis conocimientos tras su ejecución. Mi mayor agradecimiento a todo el personal de la empresa: de campo, administrativo y directivos por compartir sus conocimientos, consejos y por permitirme seguir demostrando mis capacidades trabajando a su lado, prometo nunca defraudarlos.

Al Dr. Francisco Flores por ser un excelente tutor y persona, eternamente agradecida por todo su apoyo tras todas las adversidades en el desarrollo del proyecto y por todos sus conocimientos compartidos tanto como docente y como tutor.

Índice de Contenidos

Resultado del análisis de Copyleaks.....	2
Certificación.....	2
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de Contenidos.....	9
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras.....	13
Abreviaturas.....	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del problema.....	17
Justificación del problema.....	18
Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	20
Hipótesis.....	20
Capítulo II: Marco teórico.....	21
Rosas.....	21

	10
Taxonomía.....	21
Genética de la Rosa	21
Propagación vegetativa o asexual	22
Caracterización de Variedades de Rosa	24
Caracterización por Marcadores Morfológicos.....	25
Caracterización por Marcadores Bioquímicos.....	25
Caracterización por Marcadores Moleculares.....	26
Uso de los STMS para caracterización de rosas y portainjertos de rosa.....	33
Marco Legal	35
Registro de Variedades Comerciales.....	35
Protección de variedades vegetales.....	35
Uso de marcadores moleculares para la protección de variedades vegetales.....	36
Capítulo III: Materiales y métodos.....	36
Zona de estudio	36
Recolección de Muestras	36
Extracción de ADN.....	37
Análisis de la Cantidad, Calidad e Integridad del ADN.....	37
Amplificación por PCR	38
Visualización de los Productos de Amplificación.....	41
Análisis de los Productos Amplificados	41
Lectura y análisis de alelos de STMS.....	41
Índice de Contenido Polimórfico (PIC):	41
Poder discriminante (D)	42

Combinaciones Óptimas de STMS para diferenciar el germoplasma.....	43
Capítulo IV: Resultados	44
Extracción y cuantificación de ADN.....	44
Amplificación de los marcadores STMS	45
Huella genética del portainjerto de rosa #BG-1177	48
Número de alelos observados.....	48
Análisis estadístico.....	49
Índice de Contenido Polimórfico (PIC), Probabilidad de confusión (Cj) y Poder discriminante (D).....	49
Combinaciones Óptimas de STMS	50
Capítulo V: Discusión.....	54
Capítulo VI: Conclusiones.....	60
Capítulo VII: Recomendaciones.....	61
Capítulo VIII: Bibliografía	62

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Portainjertos de Rosas Pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Empresa “Agroinnovación S.A.”</i>	37
Tabla 2 Conjunto de Marcadores STMS seleccionados para el estudio.	39
Tabla 3 Componentes para una reacción de PCR convencional para un volumen de reacción de 25 μ l.	40
Tabla 4 Programación del termociclador para la PCR	40
Tabla 5 Concentraciones y absorbancias del ADN extraído.	44
Tabla 6 Tamaño en pares de bases (pb) de los Productos de PCR amplificados con los 15 STMS	47
Tabla 7 Número de alelos observados y peso molecular expresados en pares de bases de los 15 STMS considerando las diez variedades de portainjertos	49
Tabla 8 Índices de discriminación de los marcadores microsatélites STMS	50
Tabla 9 Combinaciones de marcadores STMS más informativos	51
Tabla 10 Marcadores STMS que permiten diferenciar al portainjerto #BG-1177 de las diferentes muestras estudiadas.	53

Índice de Figuras

Figura 1 Injerto de escudete o en “T”	24
Figura 2 Deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN.....	30
Figura 3 Entrecruzamiento desigual.....	31
Figura 4 Terminología de la literatura para microsatélites	32
Figura 5 Bandas del producto de extracción de las 10 variedades de portainjerto de rosas.....	45
Figura 6 Geles de agarosa de los productos de amplificación de 15 marcadores STMS.	46
Figura 7 Portainjerto de rosa #BG-1177 amplificado con los 15 marcadores STMS... 48	48
Figura 8 Portainjerto de rosa #BG-1177 amplificado con el conjunto de marcadores STMS más informativos.....	51
Figura 9 Productos de amplificación del conjunto de los 6 marcadores STMS más informativos.	52

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

BG: Banco de Germoplasma

BMT: Grupo de Trabajo sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DHE: Examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad

dNTPs: Desoxirribonucleótidos

PIC: Índice de Contenido Polimórfico

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PVP: Poli Vinil Poli Pirrolidona

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SENADI: Servicio Nacional de Derechos Intelectuales

SSR: Repeticiones de Secuencias Simples

SSRP: Polimorfismos de repetición de secuencia simple

STMS: Sequence-Tagged Microsatellite Site

STS: Sitios Marcados por Secuencia

TAE: Tris-acetato-EDTA

UPOV: Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

VNTR: Número variable de repeticiones en tándem

Resumen

Las rosas son las flores más conocidas, cultivadas y solicitadas como flores de corte en todo el mundo, esto se debe a la amplia variedad de colores, tonos y combinaciones que presenta. Las rosas pueden propagarse por métodos sexuales como semillas y métodos asexuales en donde la utilización de portainjertos de rosas para su propagación es la práctica más común. Los marcadores microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS) permiten la identificación de diferentes genotipos de rosa. En total, se utilizaron 15 marcadores STMS de seis grupos de ligación diferentes, para caracterizar 10 variedades de portainjertos de rosa pertenecientes al banco de germoplasma de la empresa "Agroinnovación S.A.". De los 15 STMS utilizados, 14 exhibieron polimorfismos y se identificaron 49 alelos, en donde el número de alelos amplificados por marcador estuvo entre 2 a 6 alelos por locus, los loci RhAB15, RhO507 y RhAB22, presentaron de 5 a 6 alelos y obtuvieron valores de PIC superiores a 0,5; considerándolos los STMS más polimórficos en el estudio. Gracias a la determinación de la combinación óptima de marcadores más informativos se logró la obtención de la huella genética de portainjerto de rosa #BG-1177 con tan solo 6 microsatélites, permitiendo así su fácil diferenciación entre las otras variedades analizadas en el presente estudio. Estos marcadores serán un mecanismo útil para proteger la propagación ilegal del patrón de rosa #BG-1177.

Palabras clave: Huella genética, portainjerto de rosa, marcadores moleculares, STMS, índice de contenido polimórfico

Abstract

Roses are the most known, cultivated and requested flowers throughout the world, this is due to the high variety of colors, tones and combinations that they present. Roses can be propagated by sexual methods such as seeds and asexual methods, the use of rose rootstocks for propagation is the most common practice. The microsatellite markers: Sequence-Tagged Microsatellite Site (STMS) are a highly effective tool for the identification of rose genotypes. In total, 15 STMS markers from 6 different ligation groups were used to characterize 10 varieties of rose rootstock belonging to the germplasm of the company "Agroinnovación S.A." Of the 15 STMS used, 14 exhibited polymorphisms and 49 alleles were identified. The number of amplified alleles per marker was between 2 to 6 alleles per locus. The RhAB15, RhO507, and RhAB22 loci amplified 5 to 6 alleles and obtained PIC values greater than 0.5; making them the most polymorphic STMS in the study. By the determination of the optimal combination of the most informative markers, we obtained the genetic fingerprint of rose rootstock #BG-1177 with only 6 microsatellites, thus allowing its easy differentiation between the other varieties analyzed in the present study. These markers will be a helpful mechanism to protect the illegal propagation of the rose rootstock #BG-1177

Keywords: Fingerprinting, rose rootstock, molecular markers, STMS, polymorphic information content

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Las rosas son una de los géneros más conocidos, cultivados y solicitados como flor de corte en todo el mundo, esto se debe a la amplia variedad de colores, tonos y combinaciones que presenta (Vásquez, 2010). En Ecuador representan el principal cultivo contribuyente al mercado florícola. Según datos de EXPOFLORES, entre enero y octubre de 2021, el 71% de las exportaciones de flores las concentra las rosas (Expoflores, 2021).

Las rosas pueden propagarse por métodos sexuales como semillas y métodos asexuales como esquejes, injertos, corte-injerto (stent), corte-brotación, en ciernes y por medio de cultivo de tejidos (Pourghorban et al., 2019). En donde la utilización de portainjertos de rosas para su propagación es la práctica más común (Izadi et al., 2014).

Gracias a la buena ubicación geográfica de las fincas ecuatorianas, en donde el 77% se encuentran en la provincia de Pichincha y el 12% en Cotopaxi, con altitudes que van de 2.800 a 3.000 metros, conjunto a climas de lluvias constantes y temperaturas frescas, las rosas ecuatorianas logran tener características únicas tales como: tallos gruesos y largos que pueden alcanzar los 50 a 80 cm, grandes botones a alrededor de 5 a 8 cm, botones con aproximadamente 40 pétalos, colores vivos, y una larga vida en florero (Navarrete, 2018) (Vila, 2018).

Para mantener competitivo el mercado de flor de corte, es necesario la obtención de variedades vegetales, que proporcionen a la industria florícola las características que demanda (Yépez, 2017). Razón por la cual los obtentores de flores ecuatorianas buscan siempre estar a la vanguardia de la tendencia de las diferentes variedades en cuanto a colores y formas (Paredes, 2019).

El Servicio Nacional de Derechos Intelectuales (SENADI) rige la protección de las diferentes variedades vegetales en Ecuador, establecen el tiempo que dura la protección y las diferentes normativas, ayudando de esa manera a combatir la piratería que generalmente se produce al no pagar las regalías (Yépez, 2017).

Para el registro y la protección de variedades de rosas modernas, se puede seguir las directrices que menciona la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) (Esselink et al., 2003). La identificación y caracterización de variedades de rosas o de portainjertos de rosas se puede realizar mediante métodos tradicionales, los cuales se basan en marcadores morfológicos; o mediante métodos modernos, basados en la aplicación de marcadores moleculares (Azofeifa, 2006).

El uso de marcadores morfológicos es limitado y cada vez menos eficiente, debido a que su expresión depende de diferentes factores ambientales o fenológicos, y su evaluación sólo es posible cuando la planta llega a un estado adulto (Azofeifa, 2006). Se limita aún más para el caso de portainjertos debido a que una vez realizado el injerto, no hay material sobre el suelo disponible para su identificación a simple vista (Liu et al., 2007). Otra razón que limita el uso de estos marcadores morfológicos para la identificación de portainjertos, se debe a que las diferencias morfológicas entre las diferentes variedades son mínimas (Esselink et al., 2003).

Justificación del problema

Para evitar la identificación errónea mediante marcadores morfológicos y proteger las diferentes variedades de plantas mediante patentes, se precisa la obtención de huellas genéticas como una herramienta de identificación de portainjertos (Liu et al., 2007).

A través de los años con el desarrollo de la biología molecular, se han establecido diferentes técnicas de caracterización molecular mediante marcadores

moleculares (Arzate et al., 2014). Los cuales presentan diferentes ventajas frente a los morfológicos, como son: mayor segregación (más polimorfismos), permiten la evaluación de las plántulas desde etapas iniciales de desarrollo, aplicación a cualquier parte vegetal, análisis independiente de la época del año, identificación sin el uso de varias características y carencia de efectos epistáticos (Azofeifa, 2006).

La tecnología de marcadores moleculares permite la caracterización molecular de un gran número de genotipos a través de técnicas sencillas y económicas (Serrote et al., 2019).

Los microsatélites, a diferencia de otros marcadores, son altamente polimórficos y tienen la ventaja de proporcionar un sistema de marcador codominante. En específico, el uso de marcadores microsatélites STMS, proporciona patrones de bandas simples y facilita el almacenamiento de datos, ya que permite agregar fácilmente marcadores de nuevas variedades a una base de datos existente (Esselink et al., 2003).

Las investigaciones desarrolladas en los trabajos de Vosman et al. (2001), Esselink et al. (2003) y Vosman et al. (2006) indican la factibilidad de la identificación de variedades de rosas basada en la variabilidad de microsatélites, lo que hace posible el desarrollo de la huella genética del portainjerto de interés #BG-1177, utilizando marcadores previamente estudiados.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar molecularmente el portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa

“Agroinnovación S.A.” mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS).

Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo para la extracción de ADN de hojas del portainjerto de rosa #BG-1177.
- Establecer las condiciones óptimas para la amplificación de marcadores moleculares STMS a partir de ADN de hojas del portainjerto de rosa #BG-1177.
- Determinar las frecuencias alélicas específicas del portainjerto de rosa #BG-1177 mediante el uso de marcadores moleculares STMS.

Hipótesis

El portainjerto de rosa #BG-1177 se caracteriza molecularmente mediante microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS).

Capítulo II: Marco teórico

Rosas

El género *Rosa* está compuesto principalmente por un conjunto de arbustos generalmente espinosos y bien florecidos, son los principales miembros de la familia de las rosáceas, a las flores de este género se les conoce como rosas y a la planta como rosal (Ceñedo, 2015).

Los rosales son de las plantas ornamentales más cultivadas en todo el mundo, por su gran variedad de características, como forma, color y fragancia de las flores. Se usan como plantas ornamentales de jardín y flores cortadas; y tienen una gran demanda en las industrias de perfumería y cosmética (Bendahmane et al., 2013).

Taxonomía

Dentro de la familia Rosaceae encontramos a el género *Rosa* (Arzate et al., 2014). Se distinguen cuatro subgéneros: *Hulthemia*, *Platyrhodon*, *Hesperodos* y *Rosa*; en esta clasificación, el subgénero más grande *Rosa* se subdivide en diez tramos, en donde el tramo *Rosa* del mismo nombre comprende casi todas las variedades cultivadas (Debener & Linde, 2009). Rosaceae es una familia grande y diversa que comprende alrededor de 100 géneros con aproximadamente 3000 especies, de las cuales alrededor de 90 especies de esta familia son económicamente importantes (Longhi et al., 2014). Las evidencias moleculares indican que se deben aplicar varias modificaciones a la actual taxonomía de *Rosa*, demostrando la complejidad de las relaciones causadas por extensos eventos de hibridación, la radiación reciente, la poliploidía y la especiación incompleta (Debener & Linde, 2009).

Genética de la Rosa

La rosa tiene 7 cromosomas y su ploidía va de diploide ($2n=2x=14$) hasta octoploide, $2n=8x=56$ (Akonda et al., 2012), en donde aproximadamente la mitad de las especies son diploides (Fatih, 2003). Los cromosomas son pequeños y tienen un

contenido promedio de ADN de 1,1 pg/2C (en rosas diploides) (Yokoya et al., 2000). A pesar de que tienen un bajo número de cromosomas y pequeño tamaño del genoma, se sabe poco sobre su genética, esto se debe a su alto grado de heterocigocidad, niveles variables de ploidía entre especies, dificultad en la reproducción sexual, entre otras (Yan, 2005).

Las especies de rosa que son base de las variedades actuales, son (López, 1991, como se citó en Arzate et al., 2014): *R. multiflora* ($2n=2x=14$), *R. indica* ($2n=2x$, $3x$, $4x$), *R. manetti* ($2n=4x$, $5x$, $6x$), *R. canina* ($2n=4x$, $5x$, $6x$), entre otras. Debido a la complejidad de estas poliploidías, es difícil realizar análisis genéticos dentro de este grupo de plantas a través de experimentos de reproducción, por lo que aún no se ha estudiado el alcance de la diversidad genética existente en cultivares de rosas híbridas. Las técnicas moleculares se emplean cada vez más para aclarar mejor las relaciones filogenéticas entre las especies de rosas y la variación genética entre las distintas variedades (Akonda et al., 2012).

Propagación vegetativa o asexual

Como su nombre lo dice se basa en el uso de partes vegetativas de la planta, en donde se conservan la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos individuos, pudiendo así multiplicar un buen número de plantas a partir de un simple ejemplar (Osuna et al., 2017).

Según Pourghorban et al. (2019) los métodos asexuales por los cuales pueden propagarse las rosas son: esquejes, corte-injerto ([stent](#)), cultivo de tejidos e injertos.

Esquejes. Un esqueje es cualquier parte vegetativa de la planta que se corta de la planta madre para regenerarse, formando así una planta completamente nueva (Relf & Ball, 2009). Los esquejes son pedazos de tallo, rama, raíz u hoja, que se separan de la planta madre y se coloca en condiciones favorables para producir raíces y tallos a partir de los cuales se puede desarrollar una nueva planta (Ayarde et al.,

2017). La regeneración de plantas de rosas se verá influenciada por el tipo de esquejes, el tratamiento de los esquejes y las condiciones ambientales durante el enraizamiento, en donde se pueden emplear esquejes de tallo o raíz, los cuales pueden ser simples, dobles o triples (Nagar et al., 2007).

Corte-injerto (stent): Método utilizado para la rápida propagación de rosas, en donde el corte y el injerto se realizan en una sola acción. La palabra deriva del holandés, de la combinación de "stekken" que significa "hacer un corte" y "enter" que significa "injertar" (Kroin, 2015).

Cultivo de tejidos: También conocido como micropropagación, consiste en la reproducción de miles de plantas (Villa & Arbeláez, 2019). Conjunto de técnicas que permiten el cultivo de tejidos mediante el uso de diferentes medios nutritivos, en condiciones estériles (Castilla, 2005). Entre las técnicas más usadas para el cultivo de tejidos en rosas están: el cultivo de callos, yemas, rescate de embriones y cultivo de protoplastos (Villa & Arbeláez, 2019).

Injertos. Técnica mediante la cual se combina el fruto, flor o follaje de interés de una planta, con el vigor de la raíz de otra, ya sea para resistencia a enfermedades, sequía, etc. (Derrick, 1998, como se citó en Osuna et al., 2017). Una planta injertada está formada por dos partes: una aérea (variedad de interés) y la subterránea, que define la raíz (patrón, pie o portainjerto) (Najt et al., 2011).

Generalmente los rosales que se cultivan con interés comercial se propagan por injertos, en donde se produce la inserción de una yema de la variedad de interés en forma de "T", en el portainjerto, como se observa en la Figura 1 (Yong, 2004). Las especies *R. manetti*, *R. indica*, *R. canina*, *R. multiflora* y cv. Natal Briar, generalmente son las más utilizados como portainjertos (Arzate et al., 2014). Se cree que la variedad Natal Briar es el resultado de la hibridación natural entre una *R. multiflora* y una *R. damascena* (Brichet, 2003). La utilidad de dichos portainjertos depende de diferentes

características como: ser compatibles con diferentes cultivares, no tener complejidades al momento de injertar la variedad, poseer raíces flexibles, una ramificación acorde, tener tolerancia a distintos tipos de suelos, proporcionar vigor a la variedad injertada, fácil propagación, ser tolerante a enfermedades y no tener muchas espinas (Arzate et al., 2014).

Figura 1

Injerto de escudete o en "T"



Nota. Adaptado de *Injertos y Portainjertos* [Ilustración], por Informaciones Agronómicas, 2016, Agronoticias 2012

(<https://agronoticias2012.blogspot.com/2016/03/injertos-y-portainjertos.html?M=1>)

Caracterización de Variedades de Rosa

Mediante el uso de descriptores definidos se espera llegar a medir la variabilidad genética de una colección (Hernández, 2013). Los descriptores constituyen atributos cuya expresión es fácil registrar, medir o evaluar y que hacen referencia a la estructura, forma o comportamiento de una accesión permitiendo así su fácil diferenciación (Franco & Hidalgo, 2003)

Según Becerra & Paredes (2000) a través de los años la diversidad genética en plantas ha sido evaluada mediante datos botánicos, arqueológicos, históricos y

morfológicos; y desde el punto de vista agronómico y comercial se basaban en características de heredabilidad medidas fenotípicamente, sin embargo, presentaban distintas limitaciones como: el tiempo de recolección de datos, la influencia ambiental y el reducido número de genes involucrados en el proceso.

Caracterización por Marcadores Morfológicos.

Los descriptores morfológicos son fácilmente cuantificables e identificables y pueden ser altamente heredables, permitiendo así una discriminación rápida de fenotipos observables a simple vista, por ejemplo: el color de la hoja apical, el color de la flor, ente otros (Lowe et al, 1996, como se citó en Demey et al, 2003).

Anteriormente la clasificación se basaba en rasgos morfológicos y fisiológicos sin embargo dado que estos rasgos se ven muy influenciados por el medio ambiente y por una amplia gama de superposiciones en varias características es recomendable no basarse únicamente en los caracteres morfológicos para estudiar diversidades genéticas (Lewis, 1957 como se citó en Veluru, 2020).

Caracterización por Marcadores Bioquímicos.

En la década de 1950 comenzó el uso de electroforesis para estudios de diversidad genética, en donde separaban moléculas por su movilidad por medio de solventes y mediante la aplicación de un campo eléctrico, con el avance tecnológico ya para los años 70 se demostró la existencia de las isoenzimas, que consistían en moléculas múltiples que catalizan una misma reacción, en donde el efecto sus modificaciones alélica se detectan por el cambio de la movilidad electroforética, (Becerra & Paredes, 2000). Las isoenzimas son de los marcadores bioquímicos más representativos para identificar variedades y cultivares (Royo et al., 1997). Presentan ventajas frente otros marcadores, ya que son codominantes, independientes de los efectos ambientales, apropiados para estimar parámetros poblacionales, construir mapas genéticos, relativamente más económicos que los marcadores moleculares y permiten obtener información a partir del uso de diferentes tejidos (Arzate et al., 2005).

Sin embargo, presentan algunas desventajas como: un reducido nivel polimórfico al presentar pocos alelos/locus, es necesario identificar en qué momento la proteína es estable dentro de los diferentes estadios de la planta y solo una parte del genoma se puede evaluar debido a que pocos genes estructurales están representados en estas proteínas (Becerra & Paredes, 2000).

Caracterización por Marcadores Moleculares.

Históricamente, se han usado herramientas moleculares para la caracterización e identificación de variedades (Rallo et al. 2002, como se citó en Azofeifa, 2006). A través de los años con el desarrollo de la biología molecular, se han desarrollado técnicas de caracterización molecular mediante el uso de marcadores moleculares, permitiendo de esa manera superar las limitaciones que proporcionan las técnicas de caracterización tradicionales con marcadores morfológicos (Azofeifa, 2006).

Los marcadores moleculares son secuencias de nucleótidos, que pueden investigarse a través de polimorfismos presente entre individuos. Estos polimorfismos se producen por: Inserción, delección, mutaciones puntuales, duplicación y translocación; sin embargo, no necesariamente afectan a la actividad de los genes (Azhar, et al., 2018).

Un marcador molecular ideal debe: ser polimórfico y distribuido uniformemente por todo el genoma; proporcionar una resolución adecuada de las diferencias genéticas; ser altamente reproducible y ser capaz de un mayor nivel de polimorfismos (Mondini et al., 2009). Son herramientas valiosas para el cribado y la selección de genotipos deseables, razón por la cual se han realizado esfuerzos considerables en el uso de marcadores para la identificación de variedades en rosas (Nadeem et al., 2014).

Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP). Se basan en el uso de enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN, dando como resultado un patrón migración diferente que puede ser visualizado en geles de agarosa, permitiendo distinguir distintos genotipos (Checa, 2007). Es una técnica rápida sencilla y económica que permite detectar mutaciones puntuales, posee ciertas limitaciones dado que el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción puede no estar disponible en algunos fragmentos del ADN diana (Zhang et al., 2015).

Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD). Como su nombre lo dice se basa en la amplificación de fragmentos de ADN al azar, produciéndose polimorfismos cuando se generan inserciones, deleciones o cuando existe cambios de un solo nucleótido (Becerra & Paredes, 2000). Los resultados de visualizaran como múltiples bandas de diferentes tamaños producidas a partir de la misma muestra de ADN genómico, constituyendo así una "huella genética" de dicho genoma (Babu et al., 2021).

Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP). Consiste en una técnica que se basa en la amplificación de fragmentos de ADN digerido con dos endonucleasas o enzimas de restricción produciendo fragmentos de diferentes tamaños, comúnmente se usan EcoRI, AseI, HindIII, ApaI y PstI, combinadas con MseI ó TaqI, dichas enzimas tienen alta especificidad, y reproducibilidad del patrón de fragmentos de ADN (Montaño et al., 2006). Las principales desventajas que presenta la técnica son: la herencia dominante, la incertidumbre acerca de la homología de los fragmentos amplificados de igual peso molecular, la enorme cantidad de información generada y los costos de la técnica (Melgar, 2012).

Minisatélites. También conocidas como número variable de repeticiones en tándem (VNTR) consisten en arreglos de secuencias de ADN genómico repetidas en tándem, que están presentes en plantas y animales (Stockton et al., 1992). Varían en longitud de 10 a 60 pares de base y se repiten generalmente de 5 a 50 veces, se

destacan por su alta tasa de mutación y gran diversidad en la población, no codifican proteínas, pero aparecen en todo el genoma cientos de veces, con muchas copias repetidas una al lado de la otra (Reshma & Das, 2021).

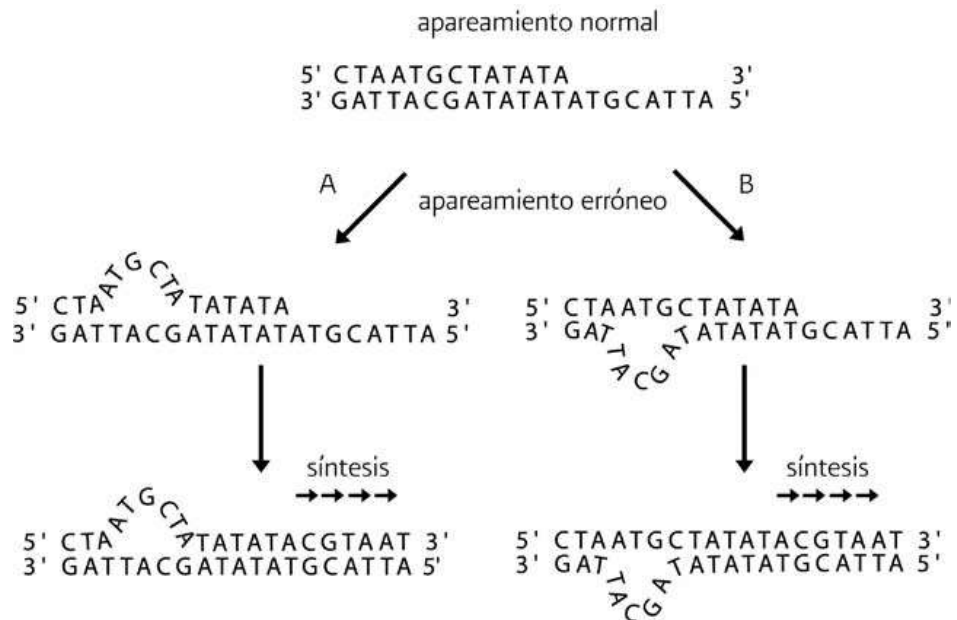
Microsatélites. Los microsatélites también denominados repeticiones de secuencia simple (SSR), sitios con etiqueta de secuencia (STS), sitio de secuencia marcada (STMS) o polimorfismos de repetición de secuencia simple (SSRP); consisten en series de motivos repetitivos cortos dentro del ADN nuclear, el número de unidades repetidas varía ampliamente entre organismos (hasta 50 copias de la unidad repetida) (Arora et al., 2012). Se encuentran de forma abundante en plantas (Condit & Hubbell, 1991). Se caracterizan por ser altamente polimórficos, reproducibles y capaces de proporcionar una herencia codominante (Kimura et al., 2006). Permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados (Becerra & Paredes, 2000). Las regiones flanqueantes se encuentran conservadas indistintamente de las altas tasas de mutaciones que presentan los microsatélites, por lo que pueden ser utilizados para la amplificación de los alelos de cada locus de estudio (Picó & Esteras, 2012). Una desventaja que presentan es el tiempo y costo que requiere el diseño de cebadores, sin embargo, gracias a que existe cierto grado de igualdad entre los microsatélites de genomas de especies distantes, existe la posibilidad de usar los mismos cebadores en más de una especie (Becerra & Paredes, 2000). Las repeticiones pueden estar compuestas por el mismo nucleótido, por dos, tres y hasta seis nucleótidos, son perfectos si la secuencia repetida no se ve interrumpida por ninguna base que no pertenezca al motivo, ejemplo: TATATATATATATATA; En los imperfectos hay un par de bases entre los motivos repetidos que no coinciden con la secuencia del motivo, ejemplo: TATATATATACTATATA, cuando hay una pequeña secuencia dentro de la secuencia repetida que no coincide con la secuencia del motivo se los denomina como interrumpidos, ejemplo TATATACGTGTATATATATA) y se conocen como como complejos cuando la secuencia contiene dos repeticiones de

secuencia distintivas adyacentes, ejemplo TATATATATAGTGTGTGT (Oliveira et al., 2006).

Las causas que conducen a la aparición de polimorfismos en los microsatélites se atribuyen a dos mecanismos de mutación: el "Slippage misspairing", en donde debido al deslizamiento que se genera en el entrecruzamiento de las dos hebras de ADN, pueden ocurrir alineamientos erróneos, si el error se produce en la hebra nueva de ADN, se genera es una inserción y si ocurre en la hebra parental se produce una delección, como se observa en la Figura 2 (Li, 1997, como se citó en Cornejo et al., 2014). El otro mecanismo es el entrecruzamiento desigual o "unequal crossing over", esto se debe a que cuando las regiones repetitivas de microsatélites están presentes, se puede formar una horquilla durante la sinapsis, por lo que se intercambiarán partes de longitud desigual, de cada cromosoma y un cromosoma recibirá un fragmento más grande debido a la mayor cantidad de repeticiones de microsatélites intercambiadas y el cromosoma homólogo recibirá una menor cantidad de repeticiones (Figura 3) (Oliveira et al., 2006).

Figura 2

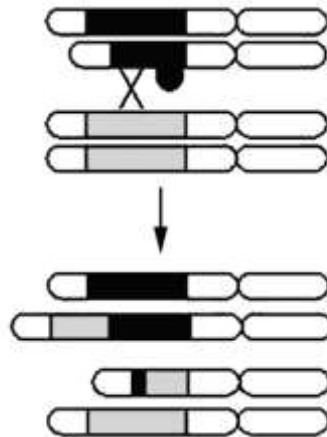
Deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN



Nota. La imagen representa el alineamiento erróneo de las hebras de ADN. A) Inserción de "TA". B) Delección "TA". Adaptado de *Herramientas Moleculares Aplicadas a Ecología Aspectos Teóricos y Prácticos* (p. 77), por Cornejo et al., 2014, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat).

Figura 3

Entrecruzamiento desigual



Nota. La imagen representa el modelo de mutación por entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos, en donde las regiones negras y grises corresponden a secuencias repetidas de microsatélites. Adaptado de *Origin, evolution and genome distribution of microsatellites* (p. 296), por Oliveira et al., 2006, *Plant Genetics*.

Estos microsatélites se han explotado de muchas maneras a través de los años, lo que ha llevado al uso de una variedad de terminología, como se observa en la figura 4, entre la cual la más representativa es “STMS”, ya que se encuentran desarrolladas para cultivos, debido a su producción en diversas bibliotecas genómicas (Gupta & Varshney, 2000).

Figura 4

Terminología de la literatura para microsatélites

Terminology		References
Abbreviation	Expanded from	
SSR	Simple sequence repeat	Hearne et al., 1992
STR	Short tandem repeat	Edwards et al., 1991
STMS	Sequence tagged microsatellite site	Beckmann & Soller, 1990
SSLP	Simple sequence length polymorphism	Tautz, 1989
MP-PCR	Microsatellite-primed PCR	Meyer et al., 1993
SPAR	Single primer amplification reaction	Gupta et al., 1994
AMP-PCR	Anchored microsatellite primed PCR	Wolff et al., 1995
ISA/ISSR	Inter-SSR amplification/Inter-simple sequence repeats	Zietkiewicz et al., 1994
ASSR	Anchored simple sequence repeat	Wu et al., 1994
RAMP	Random amplified microsatellite polymorphism	Wu et al., 1994
RAMPO	Random amplified microsatellite polymorphism	Richardson et al., 1995
RAHM	Random amplified hybridization microsatellites	Cifarelli et al., 1995
RAMS	Randomly amplified microsatellites	Ender et al., 1996
SAMPL	Selective amplification of microsatellite polymorphic loci	Morgante & Vogel, 1994
REMAP	Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism	Kalendar et al., 1999

Nota. Adaptado de *Terminología utilizada en la literatura relacionada con los microsatélites* (p. 164), por Gupta & Varshne, 2000, *Euphytica*.

Microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS). Los STMS son marcadores de ADN codominantes, que se amplifican mediante PCR utilizando un cebador único específico para la secuencia de ADN conservada que flanquea la repetición del microsatélite en combinación con un cebador universal que se ancla a los extremos 5' de los microsatélites (Hayden et al., 2002). Los STMS son por tanto secuencias repetidas en el ADN, que se utilizan para buscar ciertas secuencias repetidas en el ADN vegetal, que se amplifican generando un conjunto de bandas o picos correspondientes a cada fragmento (UPOV, 2011). Presenta la ventaja de ser marcadores de locus único, codominantes, fáciles de usar, fiables con alto contenido de información polimórfica, una detección no radiactiva automatizada, además de la disponibilidad de instrumentación estándar como el termociclador y la cámara de electroforesis (Winter et al., 2001). Sin embargo, como ya se mencionó en las desventajas en general de los microsatélites se requiere conocimiento previo de las

regiones flanqueantes para el diseño de los cebadores específicos de cada STMS, pero si un número adecuados de loci microsatélites ya se encuentran descritos y libremente disponibles para la especie a estudiar, además de tener el genoma totalmente secuenciado; la altísima variabilidad de los STMS permite la identificación de variedades con pocos estudios (Vélez, 2007).

Uso de los STMS para caracterización de rosas y portainjertos de rosa.

Para el análisis del género *Rosa* los microsatélites STMS fueron descritos por primera vez por Vosman et al. (2001). En donde describieron un conjunto de 23 STMS y las especificaciones para su amplificación por PCR (RhAB1 RhAB13 RhAB15 RhAB22 RhAB26 RhAB40, etc.) con estos 23 STMS distinguieron 26 portainjertos de rosa y 46 variedades de rosas híbridas de té y propusieron un procedimiento para implementar marcadores STMS en el registro de rosas. En 2003, Esselink et al., incluyeron un microsatélite más: RhM405 al conjunto de Vosman; utilizaron perfiles de alelos puntuables, de seis grupos de ligamiento diferentes, para caracterizar 46 variedades de té híbrido y 30 variedades de portainjertos pertenecientes a diferentes especies, en donde todas las variedades se diferenciaron por un patrón único con tan solo 3 marcadores STMS. En una publicación posterior, Yan et al. (2005) crearon un mapa genético de ligamiento de alta densidad con una serie de marcadores de anclaje para ser utilizado como una herramienta para analizar la variación genética en la rosa, utilizaron un total de 520 marcadores moleculares (AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR y marcadores morfológicos) e identificaron siete grupos de ligamiento, técnicamente correspondientes a los siete cromosomas de rosas haploides. Finalmente, en 2006, Vosman et al., del conjunto de 23 marcadores seleccionaron un subconjunto utilizando los criterios de selección como: nivel de polimorfismo, robustez, facilidad de puntuación y distribución en el genoma; y agregaron a la colección al marcador RhM405, exhibiendo así un subconjunto de 15 marcadores microsatélites para genotipado de rosas de jardín e invernadero.

Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación del ADN que se encuentra dentro de los microsatélites puede hacerse por medio de PCR y visualizarse por electroforesis (Liu, 1998, como se citó en Mathias, 2007). Se basa en el uso de la ADN polimerasa, la cual puede generar decenas de miles de millones de copias de un fragmento de ADN de interés, a partir de una plantilla de ADN. Así, es posible amplificar en cantidades muy grandes una secuencia de interés si está presente en el extracto de ADN (Kadri, 2019). La PCR se lleva a cabo mezclando: el ADN de interés, la polimerasa, los cebadores (regiones que flanquean la región a amplificar), desoxirribonucleótidos (dNTPs), co-factores como el $MgCl_2$, y una solución amortiguadora que mantenga el pH requerido (Espinosa, 2007). Consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y finalmente la extensión del ADN, las cuales se repiten continuamente en cada ciclo (Serrato et al., 2014).

Análisis de los alelos STMS. Los sistemas de marcadores se distinguen por su capacidad informativa, que a su vez depende del grado de polimorfismo. Tras el uso de los marcadores moleculares para investigación diferentes preguntas surgen a los investigadores como: ¿Qué locis polimórficos son adecuados para mi investigación?, ¿Cuántos marcadores será necesario utilizar?, ¿Qué tan polimórfico debe ser cualquier marcador seleccionado?; entre otras. Todas estas preguntas pueden responderse estimando la medida de informatividad del marcador (Chesnokov & Artemyeva, 2015). Parámetros como: el Contenido de información polimórfica (PIC) (Serrote et al., 2019); y el poder discriminatorio (D) (Mathias et al., 2007).

El Índice de Contenido Polimórfico (PIC) evalúa cuán informativo en función de polimorfismo es un marcador de acuerdo a las frecuencias de los alelos (Cadima et al., 2013). En marcadores codominantes según Botstein et al. (1980), los valores de PIC pueden variar de 0 a 1; en donde un $PIC > 0,5$ representa marcadores muy informativos, de $0,5 > PIC > 0,25$ son algo informativos y un $PIC < 0,25$ son poco informativos.

El poder discriminante (D_j) de cada marcador permite comparar la eficiencia de los marcadores en las identificaciones varietales, en donde C_j es la probabilidad de confusión es decir la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar del total del germoplasma evaluado tengan patrones de bandas idénticos, entonces $D = 1 - C_j$ representa la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar tengan patrones diferentes y, por lo tanto, sean distinguibles el uno del otro (Tessier et al., 1999).

Para conocer las combinaciones óptimas de los STMS que permitan diferenciar la totalidad del germoplasma se puede determinar el número total de pares de genotipos no diferenciados X_k mediante el uso del PIC (Tessier et al., 1999).

Marco Legal

Registro de Variedades Comerciales.

La protección de variedades de rosas en Ecuador se rige por el Servicio Nacional de Derechos Intelectuales (SENADI) en donde se establece la normativa vigente del pago de registro de la variedad mediante regalías y mantenimiento por el tiempo que dura el registro de la variedad (Yépez, 2017).

Protección de variedades vegetales.

La protección de las obtenciones vegetales, también denominada “derecho de obtentor” tiene por objetivo retribuir por tiempo determinado el trabajo, la investigación y los recursos que conlleva obtener una nueva variedad vegetal (Concha, 2019).

Según Hernández (2000) existen dos tipos de protecciones para nuevas variedades vegetales, una por medio de patentes, para eso debe cumplir con los requisitos de novedad, altura inventiva y aplicabilidad industrial; y la otra por medio de certificados de obtención, en donde se debe cumplir con los requisitos de novedad, distinguibilidad, homogeneidad, estabilidad, y tener una denominación propia que las diferencie de otras variedades del mismo género o especie, para lo cual se debe pasar un examen técnico (Vélez, 2007).

Según la UPOV (documento TG/1/3) la protección solo puede concederse una vez que la variedad haya demostrado que cumple con los requisitos del examen "DUS" por sus siglas en inglés en específico, que la variedad sea distinta, uniforme y estable o "DHE " en español (UPOV, 2002) .

La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) como su nombre lo dice se encarga de dicha protección a las obtenciones vegetales con el fin de fomentar la creación de nuevas variedades que proporcionen beneficios a la sociedad y su debida retribución tras la investigación (Carvalho et al., 2016).

Uso de marcadores moleculares para la protección de variedades vegetales.

Según Vélez (2007) para que un nuevo marcador molecular pueda ser incorporado en los exámenes DHE, se debe demostrar su utilidad para la distinción, debe ser homogéneo y estable; los obtentores y organizaciones que otorgan los títulos se oponen a que solo se usen marcadores moleculares en los exámenes DHE, pero no se oponen a su uso conjunto los marcadores morfológicos oficiales.

Capítulo III: Materiales y métodos

Zona de estudio

El proyecto de titulación se desarrolló en el Laboratorio de Citogenética y Molecular de la empresa "Agroinnovación S.A.", ubicada en Calle B, Parroquia El Quinche, Provincia de Pichincha, en las coordenadas 0°04'38.9"S 78°18'44.8"W. Tuvo una duración de ocho meses desde su planteamiento en octubre 2021 hasta su presentación en junio 2022.

Recolección de Muestras

Las muestras de hojas recientemente expandidas de 10 variedades de portainjertos de rosas del banco de germoplasma (Tabla 1) fueron proporcionadas por

la empresa “Agroinnovación S.A.” y se colocaron a -20 °C hasta el proceso de extracción de ADN.

Tabla 1

Portainjertos de Rosas Pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Empresa “Agroinnovación S.A.”

Portainjerto	#BG
1	1177
2	881
3	744
4	553
5	1178
6	837
7	1041
8	882
9	883
10	746

Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico de los tejidos de hojas jóvenes sin expandir de los portainjertos de rosas mediante el método de extracción de ADN rápido sin nitrógeno líquido, modificación del conocido método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) propuesto por Ferdous et al., (2012); el proceso no será detallado debido al acuerdo de confidencialidad propuesto por la empresa “Agroinnovación S.A”.

Análisis de la Cantidad, Calidad e Integridad del ADN.

La cantidad del ADN se midió por medio de un fluorómetro (Qubit™ 4); para lo cual se utilizó el kit “1X dsDNA High Sensitivity (HS)”, se utilizó 2 µL del ADN extraído y se analizaron los valores en las unidades de concentración ng/µL.

La calidad del ADN se midió utilizando 1 μ L del ADN extraído y se analizó la relación de absorbancia A260/230 y A260/280 mediante el uso del espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

La integridad del ADN se observó por medio de un gel de agarosa al 1% con SYBR Safe y TAE 1X. Se observó el gel resultante en un Transiluminador UV marca Labnet. Los detalles de la corrida electroforética no se detallan debido a la ley de confidencialidad manejada por la empresa “Agroinnovación S.A.”

Amplificación por PCR

Se usó un conjunto de 15 marcadores microsatélites “STMS” desarrollados por Vosman, et al. (2006), indicados en la Tabla 2, y se amplificaron en reacciones de PCR, para lo cual se usaron 2 plantas de cada variedad de portainjerto mostrado en la tabla 1. Dado que según la UPOV “solo se necesitarían dos plantas para el examen del marcador STMS” (UPOV, 2011, p. 18).

Tabla 2

Conjunto de Marcadores STMS seleccionados para el estudio.

	STMS	Secuencias repetidas	Grupo de ligación
1	RhO517	(GAC) ₇	1
2	RhEO506	(CAG) ₆ (CAA) ₁₈ - 7(CAG) ₆	2
3	RhD221	(TCT) ₂₁₋₁	4
4	RhE2b	(TGT) ₂₀₋₆	6
5	RhB303	(GA) ₁₁	Desconocido
6	RhP519	(TGA) ₁₁₋₁	Desconocido
7	RhAB40	(TC) ₁₄ (AC) ₁₁₋₁	4
8	RhD201	(TCT) ₃₃	Desconocido
9	RhAB22	(GT) ₁₃ (GA) ₁₃	6
10	RhP50	-	3
11	RhP518	(CAT) ₄ CAATT(CAT) ₆	5
12	RhAB73	-	7
13	RhM405	(TCTGAT) ₅	Desconocido
14	RhAB15	(GT) ₁₉₋₂ (GA) ₁₆	2
15	RhO507	-	4

Nota. Basado en los trabajos desarrollados por Vosman et al. (2001), Esselink et al. (2003) y Vosman et al. (2006).

Para la reacción de PCR se utilizó GoTaq® Green Master Mix, junto con los componentes mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3

Componentes para una reacción de PCR convencional para un volumen de reacción de 25 µl.

Componente, Concentración stock	Concentración final	Volumen de trabajo
GoTaq® Green Master Mix, 2X	1X	12,5 µL
Primer Forward, 10 µM	1.0µM	1 µL
Primer Reverse, 10 µM	1.0µM	1 µL
ADN	<250ng	1 µL
Agua libre de nucleasas	-	8,5 µL
Volumen final		25 µL

Nota. Basado en *Product Information (9PIM712): GoTaq® Green Master Mix.*

Promega., 2021

El perfil térmico para PCR optimizado en número de ciclos y temperatura de hibridación utilizados se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Programación del termociclador para la PCR

Proceso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	Correspondiente a cada primer
Hibridación	*	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión Final	72°C	5min	1

Nota. El número de ciclos y la temperatura de hibridación correspondiente a cada primer no se detalla debido al acuerdo de confidencialidad de la empresa

“Agroinnovación S.A.” con Vosman y colaboradores. Basado en *Product Information (9PIM712): GoTaq® Green Master Mix.* Promega., 2021.

Visualización de los Productos de Amplificación.

Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa, con buffer TAE 1X, mezclados con Syber SAFE. Finalmente se observaron los geles resultantes en un Transiluminador UV marca Labnet. Los detalles de la corrida electroforética no se detallan debido a la ley de confidencialidad manejada por la empresa “Agroinnovación S.A.”

Se determinaron los tamaños de los fragmentos amplificados de cada una de las variedades comparándolos con una escalera de longitudes de pb conocidas, que tienen fragmentos de ADN cada 25 pb y 50 pb; y se hizo un registro fotográfico de cada gel.

Análisis de los Productos Amplificados

Se construyeron patrones alélicos en donde se registró el número de alelos observados y el tamaño expresado en pares de bases para cada marcador molecular utilizado, considerando las diez variedades de portainjertos.

Lectura y análisis de alelos de STMS

Se construyó una matriz binaria de la frecuencia de los alelos, de tal manera que cada alelo visible se registró como presente, con el valor 1 y como ausente con el valor de 0 (Esselink et al., 2003). Con esta matriz se valoró el nivel de polimorfismo y las combinaciones óptimas de STMS.

Índice de Contenido Polimórfico (PIC):

La siguiente ecuación se utiliza comúnmente para determinar el PIC para los marcadores codominantes:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n pi^2 - (\sum_{i=1}^n pi^2)^2 + \sum_{i=1}^n pi^4 \quad (\text{Botstein, 1980}).$$

En donde:

n = número de alelos;

P_i : frecuencia alélica, número de veces que se observa un alelo (x_i)

dentro del total de alelos para un locus

$$p_i = \frac{x_i}{n}$$

En donde:

x_i : número de copias génicas en una muestra.

n = número de alelos

Poder discriminante (D)

C es la probabilidad de confusión, esto es la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar de todas las muestras tengan patrones de bandas idénticos. Por lo que el poder discriminante o la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar tengan patrones diferentes (Tessier et al., 1999). Es expresado por:

$$D = 1 - C_j$$

En donde:

C_j : Probabilidad de confusión para el j-ésimo cebador.

La Probabilidad de confusión C_j es igual a la suma de los diferentes c_i para todos los patrones I generados por el cebador (Tessier et al., 1999).

$$C_j = \sum_{i=1}^I c_i$$

$$c_i = P_i \frac{(NP_i - 1)}{N - 1}$$

En donde:

c_i : Probabilidad de confusión para el i-ésimo patrón del j-ésimo cebador dado.

N : individuos o número de genotipos

P_i : Frecuencia del i-ésimo patrón molecular revelado por cebador o locus j

Combinaciones Óptimas de STMS para diferenciar el germoplasma

Para determinar dichas combinaciones, se utilizó la metodología de Tessier et al. (1999). Para lo cual se ordenó a los marcadores según su PIC de mayor a menor, seguido se combinó al marcador de PIC superior con el inmediato inferior y así sucesivamente, después se determinó el número esperado de pares de genotipos que pueden ser confundidos (X_k) para cada combinación de marcadores realizada. Cuando dicho valor se haga cero representará la combinación de marcadores STMS con la que es posible distinguir la totalidad del germoplasma (Mathias et al., 2007). El valor de X_k es expresado por:

$$X_k = \frac{N(N-1)}{2} \prod_{j=1}^k C_j$$

En donde:

C_j : Probabilidad de confusión para el j-ésimo cebador.

N : individuos o número de genotipos.

La Probabilidad de confusión C_j es igual a la suma de los diferentes c_i para todos los patrones I generados por el cebador (Tessier et al., 1999).

$$C_j = \sum_{i=1}^I c_i$$

$$c_i = P_i \frac{(NP_i - 1)}{N - 1}$$

En donde:

c_i : Probabilidad de confusión para el i-ésimo patrón del j-ésimo cebador dado.

N : individuos o número de genotipos

P_i : Frecuencia del i-ésimo patrón molecular revelado por cebador o locus

Capítulo IV: Resultados

Extracción y cuantificación de ADN

Se utilizaron un total de diez variedades de portainjertos de rosa (tabla 1). Las especies de las variedades no se detalla debido a la ley de confidencialidad manejada por la empresa “Agroinnovación S.A.”

Los valores obtenidos de la cuantificación del ADN extraído mediante el fluorómetro (Qubit™ 4); y valores de A260/280 y A260/230 para análisis de calidad de las muestras mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 se observan en la Tabla 5.

Tabla 5

Concentraciones y absorbancias del ADN extraído.

Nº. Muestra	ID de la Muestra	Concentración- Quibit (ng/ µL)	260/280	260/230
1	1177	35,6	1,85	1,44
2	881	14,1	1,78	1,14
3	744	88,6	1,9	1,54
4	553	16,4	1,88	1,44
5	1178	39,4	1,95	1,71
6	837	15,5	1,88	1,49
7	1041	15,4	1,78	1,07
8	882	28,04	1,81	1,22
9	883	34,6	1,8	1,16
10	746	21,5	1,70	0,8

Previo a la fase de amplificación del ADN extraído, se corrió un gel de agarosa para evaluar su integridad. La electroforesis dio como resultado las bandas que se visualizan en Figura 5.

Figura 5

Bandas del producto de extracción de las 10 variedades de portainjerto de rosas.



Nota. Gel de agarosa al 1% bajo luz UV donde se visualizan 10 bandas correspondientes a extracciones de 10 variedades de portainjerto de rosas.

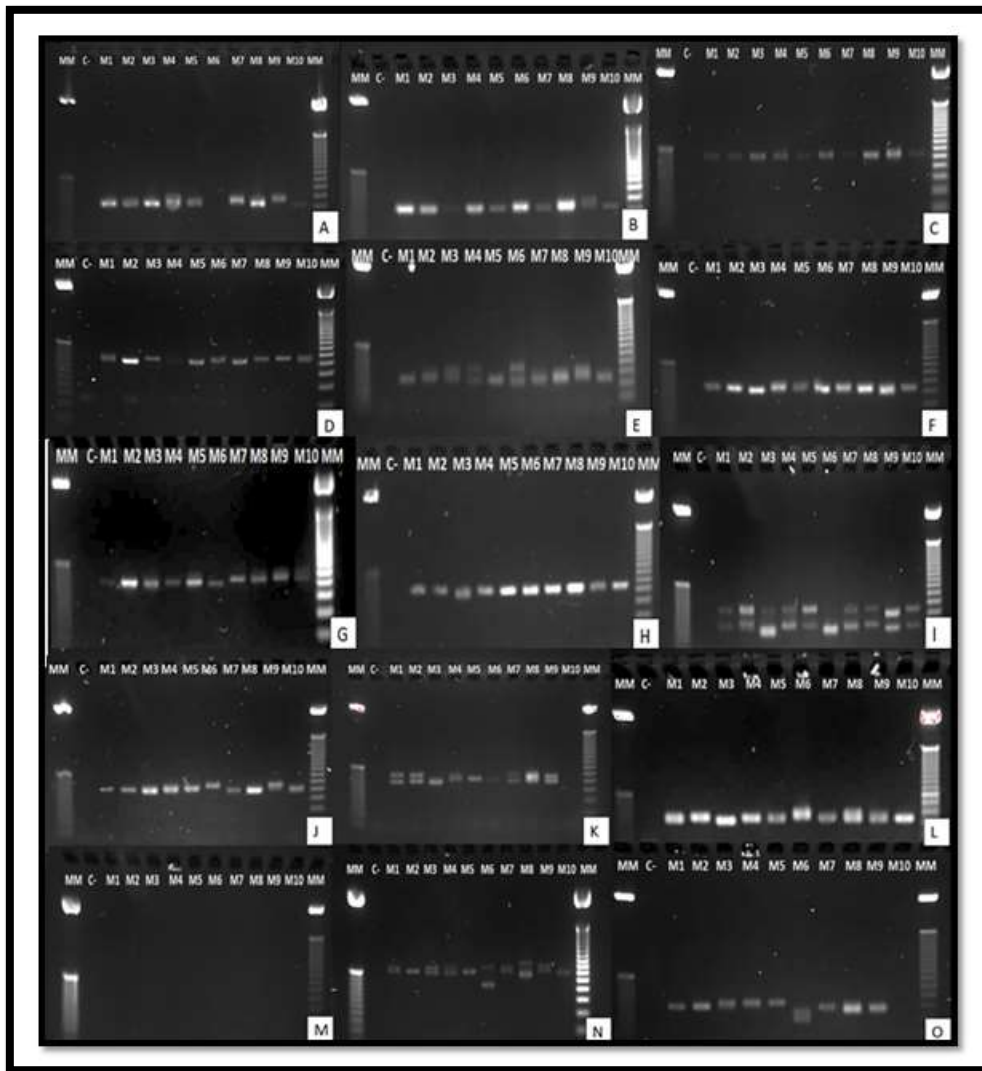
Amplificación de los marcadores STMS

Todos los marcadores STMS usados en el estudio se amplificaron mediante PCR. Se usaron 2 repeticiones de producto de ADN de cada variedad, por lo que se analizó un total de 20 muestras.

Finalmente, se realizó las amplificaciones por PCR con las condiciones de la Tabla 4, obteniendo geles de agarosa como se muestra en la Figura 6.

Figura 6

Geles de agarosa de los productos de amplificación de 15 marcadores STMS.



Nota. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del ADN de 10 muestras de portainjertos de rosa, utilizando 15 STMS en gel de agarosa al 2.5%. **MM:** marcador de peso molecular de 25pb(izq.) y 50pb(dcha.); M1- M10 muestras especificadas en *Tabla 1*; C-: Control negativo. Amplicones con el marcador molecular **(A)** RhO517. **(B)** RhEO506. **(C)** RhD221. **(D)** RhE2b. **(E)** RhB303. **(F)** RhP519. **(G)** RhAB40. **(H)** RhD201. **(I)** RhAB22. **(J)** RhP50. **(K)** RhP518. **(L)** RhAB73. **(M)** RhM405. **(N)** RhAB15. **(O)** RhO507. Imágenes procesadas en el software *Image Lab*.

Tabla 6

Tamaño en pares de bases (pb) de los Productos de PCR amplificados con los 15

STMS

Nº. Muestra	Id de la Muestra	RhO517 (pb)	RhEO506 (pb)	RhD221 (pb)	RhE2b (pb)	RhB303 (pb)	RhP519 (pb)	RhAB40 (pb)	RhD201 (pb)
1	1177	155	102	256	204	110	165	200	186
2	881	155	102	256	190	110	165	200	186
3	744	155	102	256	204	150 - 110	150	200	173
4	553	155	102	256	204	150- 110	165	200	186
5	1178	155	102	256	190	110	165	200	186
6	837	-	102	256	204	160-110	165	200	186
7	1041	170	102	262	204	110	165	215	186
8	882	155	114	256	221	110	165	215	200
9	883	180	130-114	262	221	150 - 110	150	232	209
10	746	155	102	262	221	110	165	232-215	209

Nº. Muestra	Id de la Muestra	RhAB22 (pb)	RhP50 (pb)	RhP518 (pb)	RhAB73 (pb)	RhM405 (pb)	RhAB15 (pb)	RhO507 (pb)
1	1177	157-100	183	239- 194	164	-	338- 300	143
2	881	157-100	183	239- 194	164	-	300	143
3	744	157-70	183	194	154	-	338- 300	161
4	553	157- 100	183	209	164	-	338- 300	161
5	1178	157 -100	183	209	164	-	300	161
6	837	70	222	209	183- 164	-	345- 221	112- 91
7	1041	157- 100	183	239- 194	164	-	338- 300	143
8	882	157- 100	183	229- 194	183- 164	-	380- 293	134
9	883	145- 85	222	229- 194	175- 164	-	338- 300	134
10	746	157- 100	183	-	164	-	300	-

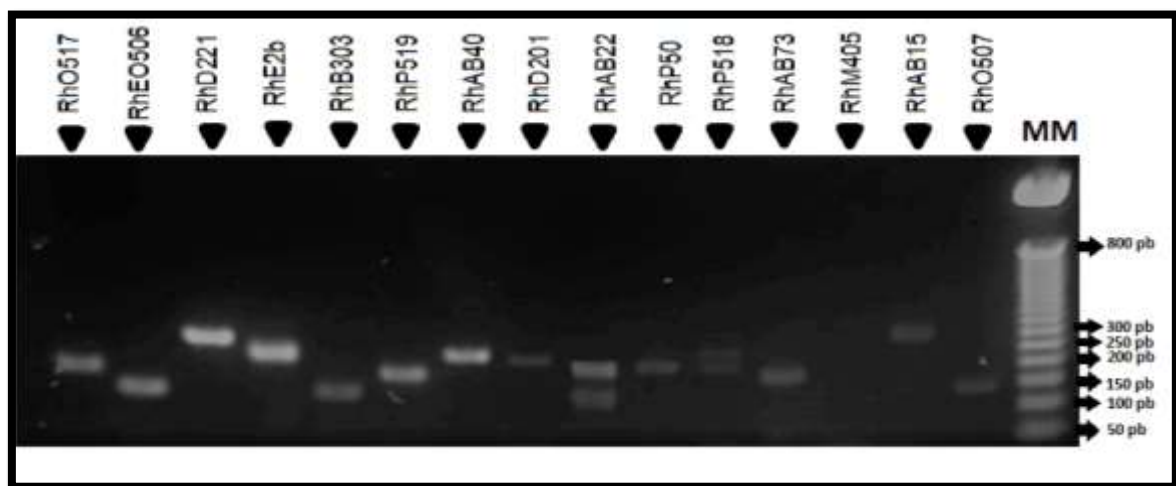
Nota. Dos valores de pb indican la amplificación de dos bandas; mientras que el símbolo (-) indica ninguna banda amplificada.

Huella genética del portainjerto de rosa #BG-1177

Se corrió un gel de agarosa al 2.5% con ADN genómico del portainjerto de rosa #BG-1177 amplificado con los 15 marcadores microsatélites STMS como se muestra en la figura 7.

Figura 7

Portainjerto de rosa #BG-1177 amplificado con los 15 marcadores STMS.



Nota. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del ADN del portainjerto de rosa #BG-1177, utilizando 15 STMS, en gel de agarosa al 2.5% con: SYBR Safe, TAE 1X.

MM: marcador de peso molecular 50pb. Imagen analizada en el software “*Image Lab*”.

Número de alelos observados

Se determinaron 49 alelos diferentes en las diez variedades estudiadas con los 15 marcadores STMS como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Número de alelos observados y peso molecular expresados en pares de bases de los 15 STMS considerando las diez variedades de portainjertos

STMS		Número de alelos observados					
		A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	RhO517	155	170	180			
2	RhEO506	102	114	130			
3	RhD221	256	262				
4	RhE2b	204	190	221			
5	RhB303	110	150	160			
6	RhP519	165	150				
7	RhAB40	200	215	232			
8	RhD201	186	173	200	209		
9	RhAB22	157	100	70	145	85	
10	RhP50	183	22				
11	RhP518	239	194	209	229		
12	RhAB73	164	154	183	175		
13	RhM405	-	-	-	-		
14	RhAB15	338	300	345	221	380	293
15	RhO507	143	161	112	91	134	

Nota. A1-A6: Número de alelos identificados; Los valores corresponden los pesos moleculares de cada alelo expresado en pares de bases (pb).

De los 15 marcadores STMS sólo 14 amplificaron productos, con un número de alelos que varió entre 2 y 6.

Análisis estadístico

Índice de Contenido Polimórfico (PIC), Probabilidad de confusión (Cj) y Poder discriminante (D)

Tabla 8*Índices de discriminación de los marcadores microsatélites STMS*

	STMS	PIC	Probabilidad de confusión (Cj)	Poder discriminante (D)
1	RhO517	0,370	0,588	0,412
2	RhEO506	0,314	0,652	0,348
3	RhD221	0,420	0,533	0,467
4	RhE2b	0,620	0,311	0,689
5	RhB303	0,439	0,512	0,488
6	RhP519	0,320	0,644	0,356
7	RhAB40	0,595	0,339	0,661
8	RhD201	0,580	0,356	0,644
9	RhAB22	0,659	0,267	0,733
10	RhP50	0,320	0,461	0,539
11	RhP518	0,704	0,218	0,782
12	RhAB73	0,485	0,461	0,539
14	RhAB15	0,678	0,246	0,754
15	RhO507	0,760	0,156	0,844
	Media	0,519	0,410	0,590

Nota. Los valores Cj y D están expresados en probabilidad.

Combinaciones Óptimas de STMS

El número mínimo de marcadores para los cuales el riesgo de confundir germoplasma sea muy bajo se observa en la tabla 9.

Tabla 9

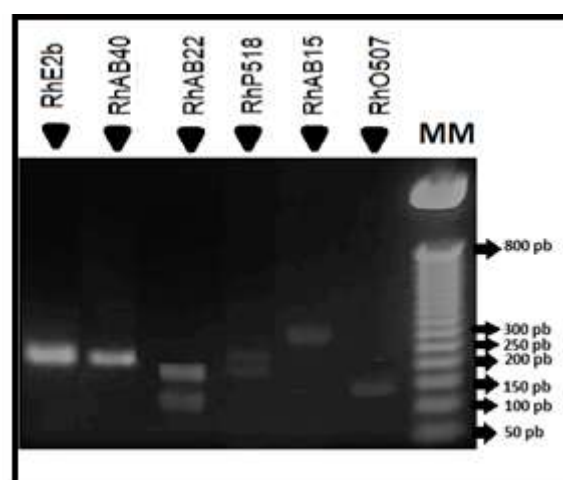
Combinaciones de marcadores STMS más informativos

Combinaciones de Marcadores STMS	Número esperado de pares de genotipo no diferenciados (Xk)
A	7,00
A+B	1,52
A+B+C	0,38
A+B+C+D	0,10
A+B+C+D+E	0,03
A+B+C+D+E+F	0,01
A+B+C+D+E+F+G	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I+J	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I+J+K	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I+J+K+L	0,00

Nota. A: RhO507, B: RhP518, C: RhAB15, D: RhAB22, E: RhE2b, F: RhAB40, G: RhD201, H: RhAB73, I: RhB303, J: RhD221, K: RhO517, L: RhP519.

Figura 8

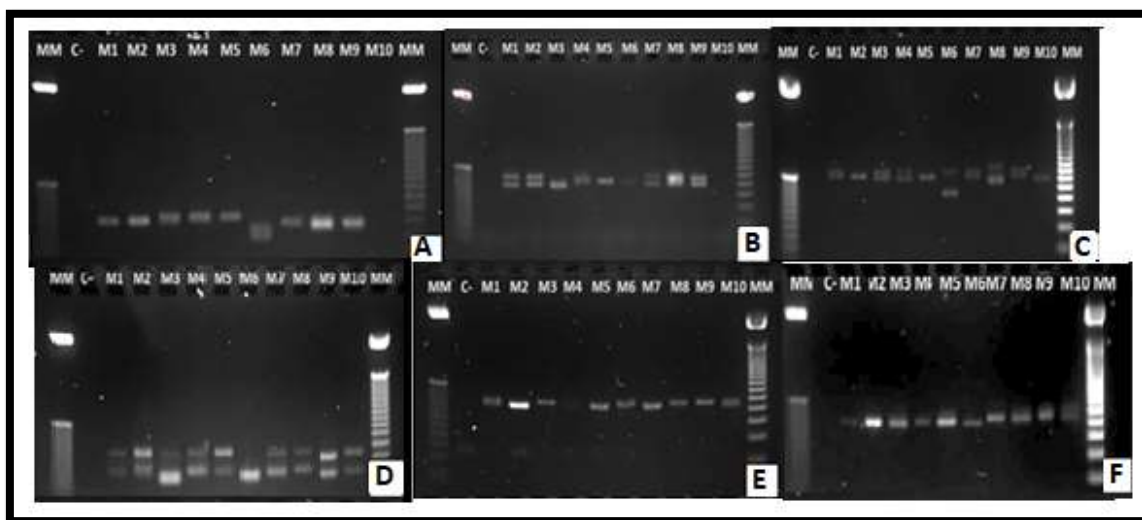
Portainjerto de rosa #BG-1177 amplificado con el conjunto de marcadores STMS más informativos



Nota. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del ADN del portainjerto de rosa #BG-1177, utilizando el conjunto más informativo de 6 marcadores STMS identificados previamente, en gel de agarosa al 2.5% con: SYBR Safe, TAE 1X. **MM:** marcador de peso molecular 50pb. Imagen procesada en el software *Image Lab*.

Figura 9

Productos de amplificación del conjunto de los 6 marcadores STMS más informativos.



Nota. Productos de PCR obtenidos de la amplificación del ADN de 10 muestras de portainjertos de rosa, utilizando el conjunto de 6 STMS más informativos identificados previamente, en gel de agarosa al 2.5%. **MM:** marcador de peso molecular de 25pb(izq.) y 50pb(dcha.); M1- M10 muestras especificadas en Tabla 1; C-: Control negativo. Amplicones con el marcador molecular **(A)** RhO507 **(B)** RhP518 **(C)** RhAB15 **(D)** RhAB22 **(E)** RhE2b **(F)** RhAB40. Imágenes procesadas en el software *Image Lab*.

Tabla 10

Marcadores STMS que permiten diferenciar al portainjerto #BG-1177 de las diferentes muestras estudiadas.

N^o. Muestra	ID de la Muestra	Marcadores STMS que permiten su diferenciación
2	881	RhAB15; RhE2b
3	744	RhO507; RhP518; RhAB22
4	553	RhO507; RhP518
5	1178	RhO507; RhP518; RhAB15; RhE2b
6	837	RhO507; RhP518; RhAB15; RhAB22
7	1041	RhAB40
8	882	RhO507; RhAB15; RhAB40
9	883	RhO507; RhP518; RhAB22; RhE2b; RhAB40
10	746	RhO507; RhP518 ; RhAB15; RhE2b; RhAB40

Nota. Marcadores STMS escogidos del conjunto más informativo de 6 marcadores STMS identificados previamente.

Capítulo V: Discusión

Los métodos de extracción de ADN utilizando nitrógeno líquido conllevan problemas relacionados con la conservación y almacenamiento de este elemento, por lo que el método del bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) se ha utilizado para la extracción de ADN de diversos materiales vegetales con resultados favorables.

Existen tres contaminantes principales asociados con el ADN vegetal que pueden causar dificultades considerables al realizar experimentos de PCR, estos son: polifenoles, polisacáridos y ARN. Estudios han demostrado que el uso de cloruro de sodio (NaCl) con los buffers de lisis han permitido eliminar polisacáridos, mientras que el uso de polivinilpirrolidona (PVP) se ha probado para eliminar compuestos polifenólicos (Arif et al., 2010).

Se obtuvo valores de A_{260/280} de 1,7 a 1,9 y de A_{260/230} de 0,8 a 1,7 (Tabla 5). Se observan valores relativamente bajos de A_{260/230} esto se puede deber a la presencia de carbohidratos o de fenol, problemas que comúnmente se los encuentra en el aislamiento de ADN en plantas (Thermo Scientific , s.f.)

Generalmente el ADN y el ARN a través de los tiempos se ha cuantificado mediante espectrofotometría; sin embargo, estas mediciones de absorbancia UV no son selectivas para el ADN, el ARN o la proteína. Los valores de absorbancia pueden variar ampliamente en presencia de contaminantes y pueden proporcionar medidas inadecuadas a concentraciones bajas de ADN y ARN; por lo que, el método de cuantificación basado en fluorescencia es ampliamente usado para superar dichos inconvenientes (Masago et al., 2021). El análisis de cantidad de ADN utilizando fluorómetro (Qubit™ 4) arrojó valores promedio de 14 a 88 ng/uL. Los marcadores moleculares microsatélites permiten su amplificación desde 5 ng hasta 50 ng de ADN por reacción (Cadima et al., 2013). Por lo que las muestras con concentraciones superiores a 25 ng/μL se diluyeron hasta obtener aproximadamente 15 ng/μL. Si la cantidad de ADN es demasiado alta, aumentará la probabilidad de hibridación de los cebadores con otras secuencias no complementarias, así como la formación de

dímeros de cebadores, lo que dará como resultado la amplificación de subproductos (Eppendorf, 2018).

Entre los marcadores de PCR, los STMS son los marcadores preferidos para selección asistida por marcadores, análisis de diversidad genética, mapas de ligamiento, entre otros; esto es, debido a su naturaleza codominante, cobertura genómica, alta abundancia y transferibilidad (Vishwakarma et al., 2019).

Todos los marcadores STMS usados en el estudio se amplificaron vía PCR; con las condiciones de amplificación provistas por Vosman y colaboradores; además, el tamaño y número de las amplificaciones fueron consistentes con estudios previos, sin embargo, no se detallan los rangos de amplificación de cada marcador debido al acuerdo de confidencialidad de la empresa “Agroinnovación S.A.” con Vosman y colaboradores.

Como se observa en la tabla 7 existen 49 alelos diferentes en las diez variedades estudiadas, con los quince marcadores STMS, en donde el número de alelos amplificados por marcador molecular estuvo entre 2 y 6. Los marcadores que mayor cantidad de alelos amplificaron fueron el RhAB15, RhO507 y RhAB22, con 6, 5 y 5, respectivamente.

Se utilizó un conjunto de 15 cebadores STMS para examinar el polimorfismo genético de portainjertos de rosa, en donde un total de 14 cebadores STMS produjeron un perfil de bandas reproducibles con un tamaño de producto de 70 pb-380 pb, mientras que el cebador RhM405 no logró amplificar el ADN genómico de ninguna de las muestras. Esto puede deberse a que el conjunto de marcadores STMS probados se desarrolló para un estudio que involucró tanto rosas de invernadero (flor cortada) como variedades de jardín al aire libre (Vosman et al., 2006), en donde el marcador RhM405 fue seleccionado para rosas de invernadero. Cabe recalcar que los portainjertos de rosa son plantas arbustivas que crecen fuera de invernadero, ya que

la mayoría de las variedades de portainjertos se clasifican taxonómicamente en varias especies de rosas silvestres (Leemans & Van der Laar, 1977 como se citó en Esselink, et al., 2003).

Como se observa en la tabla 6 en algunos microsatélites como RhD221 y RhP519 se detectó poca variabilidad en cuanto a pb expresados por muestra, esto según Cadima et al. (2013) puede deberse a que el número de alelos detectados depende en gran parte de la cantidad y diversidad de germoplasma muestreado, en este caso nuestro germoplasma evaluado fue tan solo de 10 variedades.

La detección de tamaños de los fragmentos amplificados se hizo mediante una estimación visual, por lo que no se puede descartar cierto grado de error en la detección de los distintos alelos, sobre todo cuando se diferencian por 1 o 2 pares de bases o cuando aparecen otras bandas más débiles (Pérez, 2004).

Gracias a que son marcadores de tipo codominante, se puede distinguir entre individuos homocigotos o heterocigotos si los genomas son diploides; ya que si se generan dos bandas amplificadas esto quiere decir que hay dos alelos diferentes correspondiendo a un individuo heterocigoto, mientras que si se genera una sola banda, corresponde a alelos iguales, es decir individuos homocigotos (Cornejo et al., 2014).

La puntuación codominante de los marcadores en muestras heterocigotas, que se usa para evaluar el genotipo completo de una variedad, generalmente se complica por la naturaleza poliploide de las rosas, limitando el poder discriminativo de los marcadores codominantes, razón por la cual la puntuación en rosas se debe realizar de forma dominante (Esselink et al., 2003). Sin embargo, al evaluar los portainjertos de rosa, se pudo observar que ningún marcador amplifico con más de dos bandas para ninguna variedad, esto concuerda con lo mencionado por Crane & Byrne (2003, como se citó en Yan, 2005); los cuales especifican que la mayoría de las especies silvestres son diploides, mientras que la mayoría de las rosas cultivadas son tetraploides o triploides; pudiendo suponer de esa manera que nuestros portainjertos

evaluados corresponden a especies de rosas silvestres diploides, sin embargo se necesitarían análisis de ploidías para corroborarlo.

Como se observa en la tabla 8, los valores del Índice de Contenido Polimórfico (PIC) variaron entre 0,31(RhEO506) y 0,76 (RhO507) con una media de 0,51. Los valores de la probabilidad de confusión (Cj) variaron de 0,156 (RhEO506) a 0,652 (RhO507) con una media de 0,410. Los valores del poder discriminante (Dj) de los cebadores oscilaron entre 0,348 (RhEO506) y 0,844 (RhO507). Es decir, según la estadística el marcador RhO507 corresponde al marcador más polimórfico en nuestro germoplasma evaluado.

Los valores del Índice de Contenido Polimórfico (PIC) varían de 0 a 1; en donde un PIC mayor a 0,5 representa marcadores muy informativos (Botstein et al.,1980). Nuestros resultados mostraron un conjunto de siete marcadores muy informativos con valores de PIC superiores a 0,5; los cuales fueron RhO507 (0,76), RhP518(0,70), RhAB15 (0,67), RhAB22 (0,65), RhE2b (0,62), RhAB40 (0,59), RhD201(0,58); como se muestra en la tabla 8.

Se pudo identificar que los marcadores que mayor cantidad de alelos amplificaron, resultaron ser los marcadores que mayor valor de PIC presentaron. Estos marcadores son RhAB15, RhO507 y RhAB22 con valores de PIC de 0,67, 0,76 y 0,65 y alelos amplificados 6, 5 y 5, respectivamente. Corroborando así lo mencionado por Cichero (2013) que afirma que los valores de PIC dependen del número de alelos amplificados y la distribución de sus frecuencias

El poder discriminatorio esperado (Dj) y el PIC se basa en las frecuencias alélicas, por lo que se los puede considerar valores prácticamente idénticos (Tessier et al., 1999); lo cual se observó en los resultados obtenidos (tabla 8).

Según Ahmad et al. (2019) los valores de PIC y Dj son directamente proporcionales entre sí, sin embargo, son inversamente proporcionales a Cj; por lo que cuando PIC y Dj de un marcador llegan al máximo, Cj llega al mínimo, como se observa

en la tabla 8. El marcador que tiene los valores máximos de PIC y D_j y el valor mínimo de C_j se considera excelente para la estimación de las variaciones alélicas en los genotipos. Según nuestros resultados el marcador que cumple con estas características corresponde al marcador RhO507.

Generalmente para que los métodos de identificación sean más confiables es necesario incluir la mayor cantidad posible de parámetros descriptores, sin embargo, para disminuir costos y aumentar la eficiencia de los análisis se es necesario determinar un número mínimo de marcadores con los cuales se puede distinguir el todo el germoplasma y en donde el riesgo de confundir las variedades evaluadas sea muy bajo (Narvaez et al., 2001). Siguiendo la metodología de Tessier et al. (1999) se identificó el conjunto de marcadores que permita diferenciar la totalidad del germoplasma, para lo cual los 15 marcadores STMS se ordenaron por valor de PIC decreciente y se combinaron según se indica en la tabla 9, en donde para cada combinación se determinó el número esperado de pares de genotipos que pueden ser confundidos (X_k). El valor esperado X_k llega a cero al utilizar seis o más marcadores (RhO507, RhP518, RhAB15, RhAB22, RhE2b, RhAB40, RhD201).

Gracias a la identificación de este conjunto de marcadores, la huella genética del portainjerto de rosa #BG-1177 se pudo reducir a la amplificación de tan solo 6 marcadores STMS, como se observa en la figura 8; mientras que en la figura 9 se puede visualizar los diferentes geles amplificados con los diferentes marcadores pertenecientes al conjunto identificado, a simple vista se ve que los geles amplificados corresponden a marcadores polimórficos, los cuales presentaron mayor cantidad de bandas diferentes. Comprobando así que con el uso de tan solo 6 marcadores STMS (RhO507, RhP518, RhAB15, RhAB22, RhE2b, RhAB40, RhD201) se puede diferenciar al portainjerto de rosa #BG-1177 de las otras variedades analizadas en el presente estudio, como se muestra en la Tabla 10.

El presente estudio demuestra que los STMS son un conjunto de marcadores microsatélites polimórficos, fácilmente puntuables y altamente efectivos para generar perfiles de ADN únicos en variedades de rosa (Esselink et al.,2003).

Capítulo VI: Conclusiones

- Se estandarizó un protocolo para la extracción de ADN de hojas de 10 variedades de portainjertos de rosa por un método de CTAB, sin la necesidad de usar nitrógeno líquido, obteniendo un valor medio de pureza 260/280 de 1,83 y una concentración media de 30,91 [ng/ μ L], ambos valores fueron óptimos para la amplificación de los marcadores moleculares microsatélites STMS.
- Se logró la estandarización de las condiciones para la amplificación por PCR de 14 marcadores moleculares STMS. Los loci microsatélites RhAB15, RhO507 y RhAB22, resultaron ser los más polimórficos en nuestro germoplasma evaluado, dado que presentaron de 6 a 5 alelos por locus y obtuvieron valores de PIC superiores a 0,5.
- La caracterización molecular de 10 muestras de portainjertos de rosas pertenecientes al banco de germoplasma de la empresa “Agroinnovación S.A.”, utilizando 14 marcadores microsatélites, reveló una riqueza de 49 alelos en donde el número de alelos amplificados por marcador molecular estuvo entre 2 a 6 alelos/locus.
- La identificación del conjunto de marcadores STMS más informativos, permitió la obtención de la huella genética del portainjerto de rosa #BG-1177 con tan solo 6 microsatélites, permitiendo así su fácil diferenciación entre las otras variedades analizadas en el presente estudio.
- Se aceptó la hipótesis de investigación siendo que el portainjerto de rosa #BG-1177 se caracteriza molecularmente mediante microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS).

Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda evaluar un germoplasma de portainjertos de rosa más amplio para evitar la poca variabilidad alélica de algunos marcadores STMS estudiados.
- Para evitar el grado de error generado en la detección de alelos mediante estimación visual, se recomienda utilizar sistemas de digitalización de geles.
- Realizar un estudio de secuenciación para identificar variaciones puntuales e identificar alelos con mayor precisión.
- Se recomienda la combinación de caracteres morfológicos y marcadores moleculares para *la* identificación genotípica de las diferentes variedades.
- Realizar PCR-multiplex para detectar más de una secuencia a la vez, permitiendo ahorrar tiempo, recursos y dinero en la caracterización.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Ahmad, R., Malik, W., & Akbar, M. (2019). Genetic Diversity and Selection of Suitable Molecular Markers for Characterization of Indigenous Zizyphus Germplasm. *Erwerbs-Obstbau*, 61:345–353. <https://doi.org/10.1007/s10341-019-00438-0>.
- Akonda, M., Jin, S., & Wang, X. (2012). Molecular characterization of selected wild species and miniature roses based on SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 147(2012), 89–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.028>
- Arif, Bakir, Kha, Ahamed, Farhan, A., Sadoon, A., . . . Shobrak. (2010). A Simple Method for DNA Extraction from Mature Date Palm Leaves: Impact of Sand Grinding and Composition of Lysis Buffer. *Int J Mol Sci.*, 3149-3157; doi:10.3390/ijms11093149.
- Arora, R., Singh, B., & Dhawan, A. (2012). *Theory and Practice of Integrated Pest Management*. India: Scientific Publisher.
- Arzate, A., Bautista, M., Piña, J., Reyes, J., & Vázquez, L. (2014). *Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)*. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Arzate, A., Hoyos, A., Vázquez, L., & De Guadalupe, M. (2005). Caracterización isoenzimática de nueve variedades botánicas de Tigridia pavonia (L. f.) DC. *Agrociencia*, vol.42 no.5. 519-528.
- Ayarde, L., Coaquira, D., & Cullen, H. N. (2017). *Propagación de Plantas Tipos y Técnicas de Injertos*. La Paz, Bolivia: Centro de Educación Técnica, Humanística y Agropecuaria.
- Azhar, M., Amjad, M., Qasim, M., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., & Rüştü Hatipoğlu. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and

recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 32(2),261-285.

<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>

Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 221-241.

Babu, K., Sheeja, T., Minoo, D., Rajesh, M., Samsudeen, K., & Suraby, E. (2021). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived. *Molecular Plant Taxonomy*, vol 2222. 219-247. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_13.

Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, v.60 n.3. 270-281. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007> .

Bendahmane, M., Dubois, A., Raymond, O., & Bris, M. L. (2013). Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *Journal of Experimental Botany*, 64(4),847–857. doi:10.1093/jxb/ers387

Botstein, D., White, R., Skolnick, M., & Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Society of Human Genetics*, 32:314-331 .

Brichet, H. (2003). DISTRIBUTION AND ECOLOGY | South Africa. *Encyclopedia of Rose Science*, 200-201.

Cadima, X., Veramendi, S., & Gabriel, J. (2013). Uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia. *Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivian. All rights reserved.*, 4(1):18-30.

- Carvalho, J., Santos, N., & Amat, P. (2016). Protección jurídica de la materia biológica vegetal. *Opinión Jurídica*, 15(30), 145-168.
<https://doi.org/10.22395/ojum.v15n30a7>
- Castilla, Y. (2005). Cultivo de tejidos de rosas (*rosa sp*): Un acercamiento a investigaciones recientes. *Cultivos Tropicales*, vol. 26, no. 4, p. 43-47.
- Ceñedo, M. (2015). *Recepción y acondicionamiento de materias primas y materiales de floristería*. España: ELEARNING S.L.
- Checa, M. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *La Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, Vol:20. 3213-221.
- Cichero, D. (2013). *Validación de ocho marcadores microsatélites para el análisis genético de *Mytilus chilensis**. [Tesis pregrado, Universidad de Chile].
Repositorio institucional de la Universidad de Chile:
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131543/Validacion%20de%20ocho%20marcadores%20microsatelites%20para%20el%20 analisis%20genetic o%20de%20Mytilus%20chilensis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Chesnokov, Y., & Artemyeva, A. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*, 50(5):571–578.
doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.571eng.
- Concha, R. (2019). Algunos problemas del régimen de propiedad intelectual de las obtenciones vegetales en Chile. *Ius et Praxis*, vol.25 no.2. 341-358.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-00122019000200341>.
- Condit, R., & Hubbell, S. (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34: 66-7 1.

- Cornejo, A., Serrato, A., Redón, B., & Rocha, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas a Ecología Aspectos Teóricos y Prácticos*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat).
- Debener, T., & Linde, M. (2009). Exploring Complex Ornamental Genomes: The Rose as a Model Plant. *Critical Reviews in Plant Science*, 267-280.
- Demey, J., Zambrano, A., Fuenmayor, F., & Segovia, V. (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de Yuca. *Interciencia*, 28(12): 684-689.
- Eppendorf. (27 de 07 de 2018). *Eppendorf Handling Solutions*. Recuperado el 12 de 05 de 2022, de How Much Template Will I Add to My PCR Reaction?: <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/amplification/detailview-pcr-set-up/news/how-much-template-will-i-add-to-my-pcr-reaction-1/>
- Esselink, G., Smulders, M., & Vosman, B. (2003). Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106,277–286. doi: 10.1007/s00122-002-1122-y
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Eguiarte L., V. Souza yX. Aguirre (comps.). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, 517-526.
- Expoflores. (2021). *Reporte estadístico mensual Diciembre 2021*. Obtenido de <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/12/diciembre-2021.pdf>
- Fatih, C. (2003). A review on thornless roses”,. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(19),1712-1719. <https://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2003.1712.1719>

- Ferdous, J., Hanafi, M., Rafii, M., & Muhammad, K. (2012). A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology* , Vol. 11(27), pp. 6956-6964. DOI: 10.5897/AJB11.3283 .
- Franco, T., & Hidalgo, R. (2003). *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8. V. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI),.*
- Gupta, P., & Varshney, R. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163–185. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1003910819967>
- Hayden, M., Good, G., & Sharp, P. (2002). Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs. *Nucleic Acids Research* , 30(23), e129. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2F30%2F23%2F129>
- Hernández, A. (2000). *Biodiversidad y variedades vegetales. La protección de las nuevas variedades vegetales y su relación con la diversidad biológica*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Hernández, A. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias* , 2(3): 113-118.
- Informaciones Agronómicas. (2016). Injertos y Portainjertos [Ilustración], Agronoticias 2012. <https://agronoticias2012.blogspot.com/2016/03/injertos-y-portainjertos.html?M=1>
- Izadi, Z., Alizadeh, H., & Zarei, M. (2014). Effect of Time, Cultivar and Rootstock on Success of Rose Propagation through. *Scientific Research Publishing*,, 1644-1650.

- Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*.
- Kimura, T., Nishitani, C., Iketani, H., Yamamoto, B., & Yamamoto, T. (2006). Development of microsatellite markers in rose. *Molecular Ecology Notes*, (6), 810–812. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01352.x>
- Kroin, J. (2015). PROPAGATION OF ROSES: Stenting-Simultaneously Cutting and Grafting. *Hortus USA Corp*, https://www.researchgate.net/publication/317007874_PROPAGATION_OF_ROSES_Stenting-Simultaneously_Cutting_and_Grafting?enrichId=rgreq-abc4b58ed071ec6b1af47f3cbe9f3d3b-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMxNzAwNzg3NDtBUzo0OTU0NzgZODM4OTA0MzJAMTQ5NTE0MjY2MDgzNA%3D.
- Liu, X., Reighard, G., Swire-Clark, G., & Baird, W. (2007). Peach Rootstock Identification by DNA-Fingerprinting with Microsatellite (SSR) Markers. *Journal of the American Pomological Society*, 61(4), 162-166 .
- Longhi, S., Giongo, L., Buti, M., Surbanovski, N., Viola, R., Velasco, R., & Sargen, J. A. (2014). Molecular genetics and genomics of the Rosoideae: state of the art and future perspectives. *Horticulture Research volume*, 1:1 <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.1>.
- López, J., Nieto, R., Barrientos, A., Rodríguez, E., Colinas, M., & González, M. B. (2008). Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Chapingo Serie Horticultura*, 14(2): 97-111.
- Mathias, M., Sagredo, B., & Kalazich, J. (2007). Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* ,, 67(1):3-15.

- Masago, K., Fujita, S., Oya, Y., Matsushita, H., Sasaki, E., & Kuroda, H. (2021). Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina*, 57(12), 1375; <https://doi.org/10.3390/medicina57121375>.
- Melgar, L. (2012). *Análisis de la diversidad genética de 50 accesiones de habas (vicia faba l.) mediante marcadores moleculares aifp en la región de Huancavelica*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Huancavelica] Repositorio institucional de la Universidad Nacional de Huancavelica <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/127>.
- Mondini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. (2009). Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity*, 19-35; doi:10.3390/d1010019
- Montaño, a., Villalpando, E., & Vargas, F. (2006). AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en acuicultura. , . *Interciencia*, 31(8), 563-569.
- Nadeem, M., Wang, X., Akond, M., Saeed, F., Iqbal, A., Riaz, A., & A. Y. (2014). Hybrid identification, morphological evaluation and genetic diversity analysis of Rosa × hybrida by SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 8(2):183-190.
- Nagar, P., Sharma, M., Pati, P., & Ahuja, P. (2007). Rose: Some Important Findings with Special Reference to Physiology of Flowering. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 102-114.
- Najt, E., Arjona, C., Ojer, M., Reginato, G., & Weibel, A. (2011.). *Producción de duraznos para industria* . Argentina: Universidad Nacional de Cuyo.
- Narvaez, C., Castro, H., Valenzuela, J., & Hinrichsen, P. (2001). Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile

basados en marcadores de microsatélites. *Agricultura Técnica*, 61(3), 249-261.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072001000300001>.

Navarrete, D. (Diciembre de 2018). *Cut-roses global value chain governance:*

Ecuadorian exports to The Netherlands. Obtenido de Governance and

Development Policy (GDP) [Master thesis, International Institute of Social

Studies].: <https://thesis.eur.nl/pub/46585>

Oliveira, E., Pádua, J., Zucchi, M., Vencovsky, R., & Carneiro, M. (2006). Origin,

evolution and genome distribution of microsatellites. *Plant Genetics • Genet.*

Mol. Biol., 29 (2) , 294-307. <https://doi.org/10.1590/S1415->

47572006000200018.

Osuna, H., Osuna, A., & Fierro, A. (2017). *Manual de propagación de plantas*

superiores. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Paredes, M. (2019). Posicionamiento de los floricultores ecuatorianos, frente a los

cambios y tendencias del mercado ruso, americano, europeo y chino en la

exportación de rosas de corte, como fuente para la toma de decisiones. *Tesis*

de Maestría, Universidad Internacional del Ecuador,

<https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/3834/1/T-UIDE-2210.pdf>.

Pérez, J. (2004). Evaluación de la diversidad genética de papas nativas (*Solanum*

tuberosum L. ssp. tuberosum Hawkes) silvestres y cultivadas del sur de Chile,

mediante el uso de marcadores microsatélites. [*Tesis de Licenciatura*,

Universidad Austral de Chile], Repositorio institucional de la Universidad

Austral de Chile

<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fap438e/pdf/fap438e.pdf>.

Picó, M., & Esteras, C. (20 de 07 de 2012). *Marcadores moleculares basados en PCR:*

Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats).

Microsatélites. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/16743>

- Pourghorban, M., Khaghani, S., Azadi, P., Mirzakhani, A., & Changizi, M. (2019). Propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Dolce Vita by stenting and stem cutting methods in response to diff. *Advances in horticultural science*, 105-111.
- Relf, P., & Ball, E. (2009). Propagation by Cuttings, Layering and Division. *Virginia Tech; Virginia Cooperative Extension*, VT/0919/426-002.
- Reshma, R., & Das, D. (2021). Chapter 9 - Molecular markers and its application in animal breeding. *Advances in Animal Genomics*. Editor(s): Sukanta Mondal, Ram Lakhan Singh. Academic Press, 123-140.
- Royo, J., Cabello, F., Miranda, S., Gogorcena, Gonzalez, J., Moreno, S., . . . Ortiz, J. (1997). The use of isoenzymes in characterization of grapevines(*Vitis vinifera*, L.). Influence of the environment and time of sampling . *Scientia Horticulturae* , 145-155.
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat).
- Serrote, M., Reiniger, L., Buuron, S., & Silvia Rabaiolli, S. M. (2019). Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. *Gene Gene* 726:144175 . <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>
- Stockton, T., Sonnante, G., & Gepts, P. (1992). Detection of Minisatellite Sequences in *Phaseolus vulgaris* . *Plant Molecular Biology Reporter*, 10(1) 47-59.
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J., & Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet*, (98) 171–177 . <https://doi.org/10.1007/s001220051054>
- Thermo Scientific . (s.f.). *Assessment of Nucleic Acid Purity*. In *T-042 Technical NanoDrop Spectrophotometers*. Recuperado el 11 de Mayo de 2022, de

https://medicine.yale.edu/keck/dna/protocols/tube/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios_407666_284_7035_v1.pdf

UPOV. (2002). *General Introduction to the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability and the Development of Harmonized Descriptions of New Varieties of Plants*. (TG/1/3)

https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/caj_ag_10_5/tg_1_3.pdf.

UPOV. (2011). *Posible utilización de marcadores moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DUS)*. (UPOV/INF/18/1):

https://www.upov.int/edocs/infdocs/es/upov_inf_18.pdf.

Vásquez, J. (2010). *Producción de rosas (Rosa spp.) y su importancia económica*.

México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Vélez, M. (2007). *Estudio de un sistema de marcadores microsatélites para la protección y defensa legal de variedades de vid ("Vitis vinifera L.")*. [Tesis doctoral, Universidad de Alcalá] Repositorio institucional de la Universidad de Alcalá <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/1573>.

Veluru, A., Venkataramana, K., Venkata, D., Venkata, K., Tolety, J., Bharadwaj, C., . . . Panwar, S. (2020). Characterization of Indian bred rose cultivars using

morphological and molecular markers for conservation and sustainable management. *Physiol Mol Biol Plants*, 26(1):95–106.

<https://doi.org/10.1007/s12298-019-00735-8>.

Vila, L. (4 de Oct de 2018). *Flower explosion*. Obtenido de Why Are Ecuadorian Roses The Best In The World?: <https://www.flowerexplosion.com/freshweddingflowers-blog/ecuadorian-roses.html>

- Villa, R., & Arbeláez, L. (2019). Micropropagacion in vitro de Rosa rosa sp. a partir de yemas axilares y respuesta calogénica. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 31: 10-17.
- Vishwakarma, Sanyal, Saini, Sahu, Singh, Sharma, & al., e. (2019). GLADS: A gel-less approach for detection of STMS markers in wheat and rice. *PLOS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal>.
- Vosman, B., Esselink, D., & Smulders, R. (2001). *Microsatellite markers for identification and registration of rose varieties*. Wageningen, The Netherlands.: International Union for the protection of new varieties of plants- UPOV.
- Vosman, B., Scott, E., Spellerberg, B., Barendrecht, J., Tams, S., Jones, H., & Esselink, D. (2006). *A European reference collection of rose varieties*. Wageningen, Netherlands: International Union for the protection of new varieties of plants-UPOV.
- Winter, P., Kaemmer, D., Paff, T., Geistlinger, J., Neu, C., & Kahl, G. (2001). Development and application of sequence-tagged microsatellite site (STMS) markers in chickpea (*Cicer arietinum*), banana (*Musa spp.*) and their major pathogens, *Ascochyta rabiei* and *Mycosphaerella fijiensis*. (*IAEA-TECDOC--1253*). *International Atomic Energy Agency (IAEA)*, 57-73.
- Yan, Z. (2005). *Towards efficient improvement of greenhouse grown roses: genetic analysis of vigour and Powdery Mildew Resistance*. The Netherlands: Wageningen University.
- Yan, Z., Denneboom, C., Hattendorf, A., Dolstra, O., Debener, T., Stam, P., & Visser, P. (2005). Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 110:766-777.

- Yépez, M. (28 de 12 de 2017). *Superintendencia de Control del Poder de Mercado* .
Obtenido de SCPM: <https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/VERSION-PUBLICA-SECTOR-FLORES-revisado.pdf>
- Yokoya, K., Roberts, A., Mottley, J., Lewis, R., & Brandham, P. (2000). Nuclear DNA Amounts in Roses . *Annals of Botany*, 557–561
<https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1102>.
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. . *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53-67 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217832008>.
- Zhang, Z., Chen, Z., Hou, Y., Duan, Y., Wang, J., Zhou, M., & Chen, C. (2015). PIRA-PCR for Detection of *Fusarium fujikuroi* Genotypes with Carbendazim-Resistance Alleles. *Plant Diseases*, 99:1241-1246.