

Diversidad genética y morfológica de la especie promisoría *Vaccinium meridionale* Sw. en
localidades de la Cordillera Central y Oriental de Colombia

Yuranis Miranda Montero

Trabajo de Grado para Optar el Título de Magister en Biología

Director

Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

Doctora en Ciencias agrarias con énfasis en fitopatología

Codirector

Fernando Rondón González

Doctor en Ciencias-Biología

Lorena Quintero Barrera

Magister en Ciencias Agrarias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Maestría en Biología

Bucaramanga

2021

Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, al Ministerio de Educación, al Ministerio de Industria, Comercio y Turismo de Colombia e ICETEX, Programa Ecosistema Científico - Colombia Científica del fondo Francisco José de Caldas Gran RC-FP44842-212-2018.

A Luis Carlos Rojas, Jhonatan Estiven Callejas Posada, Jhony Asdrual López Torres, Pedro Nel Osorno, Ester y Marta por su conocimiento y acompañamiento en las salidas de campo.

A los compañeros de la Escuela de Química de la UIS.

Al Semillero de Genética y Biotecnología de la UIS.

A mi mamá Marta Isabel Montero, mi hermana Yira Isabel Miranda y John Sepúlveda por todo el apoyo.

Tabla de Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	15
1.1 Objetivo General.....	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 <i>Vaccinium meridionale Sw.</i>	16
2.2 Morfología de la planta	17
2.3 Tipo de reproducción.....	18
2.4 Producción de agraz en Colombia.....	18
2.5 Diversidad genética de <i>Vaccinium meridionale Sw.</i>	20
2.6 Códigos de barras de ADN.....	21
3. VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE <i>VACCINIUM MERIDIONALE SW.</i> EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER.	23
3.1 Metodología	23
3.2 Resultados.....	25
3.3 Discusión	30
4. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE <i>VACCINIUM MERIDIONALE</i> MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES TIPO MICROSATÉLITE.	33
4.1 Metodología	33
4.2 Resultados.....	38
4.2.1 Muestreo y extracción de ADN.....	38

4.2.2 Análisis de diversidad	39
4.3 Discusión	49
5. MARCADORES PARA LA DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE <i>V.MERIDIONALE</i> MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LAS REGIONES RBCL, MATK, TRNH-PSBA Y YCF.	57
5.1 Metodología	57
5.2 Resultados	59
5.3 Discusión	65
6. CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Descriptores varietales de <i>V. meridionale</i> para la evaluación de diversidad morfológica propuestos por Ligarrreto et al., (2011) y Medina et al., (2010).....	24
Tabla 2 Frecuencias de variables cualitativas registradas en plantas de <i>V. meridionale</i> en Santander.....	26
Tabla 3 Estadística descriptiva de 7 variables cuantitativas registradas en plantas de <i>V. meridionale</i> en Santander.....	28
Tabla 4 Lista de marcadores microsatélites para la evaluación de la diversidad genética de <i>V. meridionale</i> con el número de alelos (N_a) y temperatura de hibridación (T_a).	35
Tabla 5 Localidades de muestreo de <i>V. meridionale</i> en la Cordillera Central y Oriental de Colombia.....	39
Tabla 6 Frecuencias alélicas observadas para los marcadores microsatélites	41
Tabla 7 Índices de diversidad genética en <i>V. meridionale</i> evaluada con 8 marcadores tipo microsatélite.....	43
Tabla 8 Parámetros de diversidad genética de 149 plantas de <i>V. meridionale</i> de tres regiones de la Cordillera Oriental y Central de Colombia.....	44
Tabla 9 Diferenciación genética F_{ST} por departamentos de recolección y valores de probabilidad (p -value) de la prueba de significancia estadística (arriba de la diagonal)	46
Tabla 10 Análisis molecular de varianza realizado teniendo en cuenta el departamento de procedencia de las muestras.....	48
Tabla 11 Lista de cebadores usados para obtención de posibles secuencias para barcoding de <i>Vaccinium meridionale</i>	58

Tabla 12 Muestras con producto de PCR para las regiones TrnH-psbA, rbcL, matK ,ITS y ycf 60

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Paisajes de la vereda Móngora a) zona con poca vegetación y expuesta a la luz solar y b) zona cubierta por robles.....	26
Figura 2 Biplot del primer y segundo componente principal de 5 características cuantitativas de 50 plantas silvestres de <i>V. meridionale</i> muestreadas en Santander	29
Figura 3 Fenograma con características morfológicas de plantas de <i>Vaccinium meridionale</i> muestreadas en el departamento de Santander.....	30
Figura 4 Distribución geográfica de las localidades de muestreo en a) Antioquia b) Boyacá y c) Santander.....	34
Figura 5 Variación geográfica de parámetros genéticos de <i>V. meridionale</i> en Colombia	44
Figura 6 Comparación por pares de localidades por medio de F_{ST} de las 15 localidades muestreadas en la cordillera oriental y central de Colombia	46
Figura 7 Prueba de Mantel de las 15 localidades muestreadas en la Cordillera Central y Oriental de Colombia	47
Figura 8 Estructura poblacional. a) Análisis bayesiano de conglomerados de 149 muestras de <i>V. meridionale</i> recolectadas en 15 localidades de la cordillera central y oriental de Colombia, infiriendo número de grupos $K=3$. b) Número de agrupamientos	49
Figura 9 Disposición de hojas, flores y frutos de dos especies de plantas del género <i>Vaccinium</i>	50
Figura 10 Ejemplar de <i>V. meridionale</i> recolectado en el departamento de Santander ingresado a la colección del Herbario de la Universidad Industrial de Santander	59

Figura 11 Visualización del producto de PCR de los marcadores a. rbcL b. Trnh-psba, c. matK d. ITS.....	61
Figura 12 Alineamiento de las secuencias de la región rbcL de muestras de <i>V. meridionale</i> y <i>V. floribundum</i> muestreadas en Colombia y otras especies del género <i>Vaccinium</i>	61
Figura 13 Alineamiento de las secuencias de la región TrnH-psbA de muestras de <i>V. meridionale</i> y <i>V. floribundum</i> muestreadas en Colombia y otras especies de <i>Vaccinium</i>	62
Figura 14 Alineamiento de las secuencias de la región matK de muestras de <i>V. meridionale</i> y <i>V. floribundum</i> de Colombia y Perú.....	63
Figura 15 Alineamiento de las secuencias de la región ITS de muestras de <i>V. meridionale</i> y <i>V. floribundum</i> muestreadas en Colombia y otras especies de <i>Vaccinium</i>	64
Figura 16 Alineamiento de las secuencias de la región ITS de muestras de <i>V. meridionale</i> y <i>V. floribundum</i> muestreadas en Colombia y otras especies de <i>Vaccinium</i> con sitios diferenciales para la especie <i>V. floribundum</i>	64

Lista de Apéndices

Apéndice A Información de puntos de recolección de muestras de <i>V. meridionale</i> en localidades de la cordillera oriental y central de Colombia.	82
Apéndice B Valores de P de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg de los marcadores microsatélites utilizados por departamentos y con el total del muestreo. En negrita se resaltan los valores de $p < 0.05$ para los marcadores por fuera del equilibrio H-W.	89
Apéndice C Condiciones de amplificación de los marcadores para códigos de barras	90

Resumen

Título: Diversidad genética y morfológica de la especie promisoría *Vaccinium meridionale* Sw. en localidades de la Cordillera Central y Oriental de Colombia^{1*}

Autor: Yuranis Miranda Montero^{2**}

Palabras Clave: *Vaccinium meridionale*, agraz, diversidad genética, barcoding

El agraz (*Vaccinium meridionale* Sw.) es considerada una especie promisoría debido al alto contenido de antocianinas y flavonoides en su fruto, los cuales tienen propiedades nutraceuticas. Recientemente se ha incrementado su consumo en Colombia y por lo tanto se realiza una extracción intensiva de plantas silvestres que junto con el deterioro del hábitat entre otras situaciones son las causas de que se reporte el riesgo de pérdida de diversidad para esta especie en el país. De esta manera, el objetivo de la investigación fue evaluar la diversidad morfológica plantas silvestres de *V. meridionale* provenientes del departamento de Santander y diversidad genética de *V. meridionale* en localidades de la Cordillera Central y Oriental de Colombia. Se realizó la caracterización morfológica de 14 variables cualitativas y 7 cuantitativas de las plantas muestreadas en el departamento de Santander encontrándose una alta influencia del ambiente y cambios en la fenología de la planta. En cuanto a la diversidad genética, fue evaluada mediante marcadores moleculares tipo microsatélite: 13 desarrollados para *V. floribundum* y 7 para *V. corymbosum*. Se recolectaron 149 plantas de agraz, distribuidas en 15 localidades en la Cordillera Central y Oriental de Colombia. Se encontraron valores medios de heterocigosidad (Ho: 0.48) y valores bajos de endogamia (F: -0.59 y 0.06). Al realizar la comparación de diferenciación genética entre los grupos de localidades de cada cordillera se encontraron valores altos de diferenciación (Fst: 0.18-0.28). Existe correlación entre la distancia geográfica y genética de las localidades por lo que parte de la estructura poblacional es explicada por el modelo de aislamiento por distancia. Se generaron 20 secuencias de las regiones matK, trnH e ITS que pueden ser utilizadas como códigos de barras de ADN de las especies *V. meridionale* y *V. floribundum*. Los resultados de este estudio constituyen la primera exploración a nivel genético de la especie en varias localidades del país.

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Directora: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez. Doctora en Ciencias agrarias con énfasis en fitopatología. Codirectores: Fernando Rondón González. Doctor en Ciencias-Biología. Lorena Quintero Barrera. Magister en Ciencias Agrarias.

Abstract

Title: Genetic and morphological diversity of the promising species *Vaccinium meridionale* Sw. in localities of the Central and Eastern Cordillera of Colombia ^{3*}

Author: Yuranis Miranda Montero ⁴

Key Words: *Vaccinium meridionale*, Andean Blueberry, genetic diversity, barcoding

Description:

The Andean Blueberry (*Vaccinium meridionale* Sw.) is considered a promising species owing to the high content of anthocyanins and flavonoids in its fruit, which has nutraceutical properties. Recently, its consumption has recently increased in Colombia. Therefore an intensive extraction of wild plants is carried out, which along with the deterioration of the habitat, among other situations, are the causes of the risk of biodiversity loss for this species in the country. Consequently, it has been reported a risk of genetic erosion for this species in the country. Thus, the objective of the research was to evaluate the morphological diversity of wild plants of *V. meridionale* from the Department of Santander and the genetic diversity of *V. meridionale* in localities of the Central and Eastern Cordillera of Colombia. The morphological characterization of 14 qualitative and 7 quantitative variables of the plants sampled in the department of Santander was carried out, finding a high influence of the environment and changes in the phenology of the plant. Regarding genetic diversity, it was evaluated using microsatellite molecular markers: 13 developed for *V. floribundum* and 7 for *V. corymbosum*. 149 agraz plants were collected, and distributed in 15 locations in the Central and Eastern Cordillera of Colombia. Medium values of heterozygosity (H_o : 0.48) and low values of inbreeding (F : -0.59 and 0.06) were found. When carrying out the comparison of genetic differentiation between the groups of localities of each mountain range, high values of differentiation were found (F_{st} : 0.18-0.28). There is a correlation between the geographic and genetic distance of the localities, so part of the population structure is explained by the isolation model by distance. 20 sequences of the *matk*, *trnh*, and *ITS* regions were generated that can be used as DNA barcodes of the species *V. meridionale* and *V. floribundum*. The results of this study constitute the first exploration at the genetic level of the species in several localities of the country.

³ Degree Work

^{4*} Faculty of Basic Sciences. School of Biology. Director: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez. Ph.D. in Agricultural Sciences with an emphasis in phytopathology. Co-directors: Fernando Rondón González. Doctor of Science-Biology. Lorena Quintero Barrera. Master in Agricultural Sciences.

Introducción

Cientos de plantas habitan el territorio colombiano desconociéndose aún para la ciencia su contribución y potencial a nivel alimenticio o industrial. Aun así, gracias al conocimiento de las comunidades campesinas, indígenas y raizales se tiene el indicio de su aprovechamiento, lo cual pone en manifiesto la necesidad de los trabajos transdisciplinarios en este aspecto. A nivel mundial, la familia Ericaceae tiene alrededor de 4.000 especies de las cuales las más conocidas son aquellas que se distribuyen en zonas templadas dada su importancia económica al ser plantas para cultivo u ornamentales (Luteyn y Pedraza-Peñalosa, 2021). Dentro del género *Vaccinium* las más conocidas son el arándano rojo (lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* L. Cranberry: *V. macrocarpon*) y el arándano azul (huckleberry: *V. ovatum*, *V. parvifolium*, blueberry: *V. corymbosum*, bilberry: *V. myrtullis*) (Jurikova et al., 2018).

Gracias al estudio de las plantas silvestres del género *Vaccinium*, se han domesticado y mejorado algunas especies, en las cuales se han obtenido variedades con rasgos como el bajo requerimiento de frío, la tolerancia al calor, la resistencia a la sequía y la resistencia a patógenos fúngicos entre otros (Debnath y An, 2019). Con lo cual es evidente el avance en el mercado de frutos provenientes de las sucesivas mejoras por las especies silvestres relacionadas que aportan características de interés.

Vaccinium meridionale L. (Andean blueberry) es una planta promisoría gracias a su fruto pues es una fuente importante de azúcares, vitaminas B y C, algunos minerales y a su alto contenido de agua, fibra y compuestos bioactivos como antioxidantes, antocianinas y flavonoides (Gaviria et al., 2009; Ligarreto et al., 2011). Estos compuestos han sido asociados a beneficios para la salud humana en la prevención de enfermedades cardiovasculares, degenerativas como el

Alzheimer y precaución de infecciones del tracto urinario (Garzon et al., 2010). Recientemente se ha demostrado su capacidad antiproliferativa en el cáncer colorrectal en combinación con la aspirina (Arango et al., 2022), aspectos que aumentan la necesidad de su estudio. En términos ambientales, también cumple funciones ecológicas en las zonas de subpáramo y bosque altoandino donde contribuye al sostenimiento de poblaciones de polinizadores, al alimento de fauna silvestre, procesos de restauración y erosión del suelo (Magnitskiy y Ligarreto, 2007; Rache y Pacheco, 2010). Particularidades que llaman la atención para su posible aprovechamiento.

Además de las anteriores características *V. meridionale* o el agraz es de interés para los mejoradores de arándanos por las numerosas flores desarrolladas en ramas, una concentrada floración en primavera y su estructura monopodial que es de utilidad para la cosecha mecánica (Ehlenfeldt et al., 2023; Ehlenfeldt y Luteyn, 2021) por lo cual, se adelanta investigación relacionada a la hibridación de *V. meridionale* con especies comerciales como *V. corymbosum* y *V. macrocarpon*.

En consecuencia, se han realizado investigaciones sobre la morfología de la planta, viabilidad de la semilla, aspectos sociales y económicos del establecimiento del agraz como cultivo, caracterización de los ambientes óptimos para el desarrollo de este en municipios de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia (Arias, 2017; Buitrago et al., 2015; Ligarreto et al., 2013). Sin embargo, en Santander, se ha reportado la presencia de plantas silvestres de agraz, pero no se ha generado información acerca del estado de conservación de las poblaciones naturales y su composición, así como tampoco de patrones de distribución, entre otras características importantes para lograr incentivar su cultivo y comercialización (Ligarreto, 2009).

Hay que destacar que Vetás, uno de los municipios de Santander donde se ha reportado la planta, tiene un alto índice de desempleo y las personas basan su economía en la minería ilegal, por lo que la generación de actividades productivas como la siembra y recolección de agraz podría ser una alternativa para la comunidad (Morales, 2018). De esta manera, se evidencia la necesidad de contribuir a la obtención de información sobre la biología de las plantas silvestres en el territorio con lo que se puedan adelantar procesos de conservación teniendo en cuenta que se ha reportado un posible riesgo de pérdida de diversidad en las plantas silvestres que se encuentran en el país por la deforestación y la extracción exhaustiva de sus frutos (Medina y Lobo, 2006; Ligarreto et al., 2011; Medina et al., 2015); sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un análisis de diversidad genética que permita determinar el estado de las poblaciones naturales, así como tampoco si las poblaciones están o no estructuradas genéticamente.

Por esta razón, la presente investigación tiene como objetivo obtener información acerca de la diversidad genética y morfológica de *V. meridionale* en poblaciones naturales ubicadas en los departamentos de Antioquia, Boyacá y Santander con el fin de responder a la pregunta: ¿Cuáles son las variaciones genéticas y morfológicas de muestras de *Vaccinium meridionale* Sw. procedentes de las Cordilleras Central y Oriental de Colombia?

Este documento se encuentra estructurado en cinco capítulos, de los cuales los capítulos tres, cuatro y cinco contienen la metodología, resultados y discusión de cada uno de los objetivos propuestos en la investigación.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la diversidad genética y morfológica de *Vaccinium meridionale* Sw. en localidades de la Cordillera Oriental y Central de Colombia.

1.2 Objetivos Específicos

Determinar la variabilidad morfológica en las plantas recolectadas de *Vaccinium meridionale*. en el departamento de Santander.

Estimar la diversidad y la estructura genética de *Vaccinium meridionale* mediante marcadores moleculares tipo microsatélites en localidades de la Cordillera Central y Oriental de Colombia.

Identificar marcadores para la determinación taxonómica de *V. meridionale* mediante la evaluación de las regiones *rbcL*, *matk*, *trnH-psbA* y *ycf*.

2. Marco teórico

2.1 *Vaccinium meridionale* Sw.

La familia Ericaceae, dentro de la que se encuentra el género *Vaccinium*, tiene como centro de diversidad el neotrópico, siendo Colombia y Ecuador los países con mayor número de especies de esta familia (Luteyn, 2002). El agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) se distribuye en Ecuador, Perú, Venezuela, Jamaica y Colombia. En Colombia se tiene registro de plantas colectadas en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Cauca, Santander, Valle del Cauca y Magdalena. En cuanto al rango altitudinal, se ha reportado desde los 2 357 hasta los 3 439 m s.n.m. (SIB Colombia 2019, Ligarreto, 2009).

Aunque son pocos, ya se presentan algunos cultivos comerciales en Antioquia, Cundinamarca y Boyacá, sin embargo, en algunos casos se desconoce de dónde proviene el material utilizado; por ejemplo, en Antioquia los agricultores toman las plántulas que han germinado en su entorno natural y las trasladan a un lugar más despejado con distancias entre plantas de 2 m (Prieto, 2018).

Su hábito de crecimiento es arbustivo; se encuentra distribuido en el bosque alto andino, en suelos húmedos; de pH entre los 4,2 a 5,2 y con abundante materia orgánica (Ligarreto, 2009). En el país es utilizada para la preparación de mermeladas, jugos, yogurt y vinos, entre otros productos no solo por su sabor sino por el alto contenido en antioxidantes que le confieren la clasificación como fruta nutracéutica (Gaviria et al., 2009) verificada por estudios científicos como se ha citado anteriormente.

2.2 Morfología de la planta

Según una investigación sobre plasticidad fenotípica del agraz presente en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Antioquia y Santander, la altura total media fue 159.63 cm, el diámetro del tallo en promedio fue de 3.51 cm; la longitud y ancho de la hoja fue de 2.24 y 0.96 cm; el largo de la inflorescencia de 3.03 cm y los frutos tuvieron en promedio 0.80 cm de largo por 0.83 cm de ancho (Ligarreto et al., 2011). A continuación, se describen sus características:

Hoja: Las hojas son simples, alternas, con diferentes formas (p.e. elípticas, lanceolado, ovulado), con margen ondulado y ápice frecuentemente acuminado. En la fase vegetativa son de color más claro al presentado cuando llegan a la madurez. En ocasiones tienen pigmentación rojiza o morada.

Flor: En lo relacionado a la flor, es completa-perfecta, se agrupan en inflorescencias racimosas, la corola es urceolada de 4 a 5 lóbulos, el gineceo tiene estilo glabro y ovario ínfero y el androceo está compuesto por 9 ± 1 estambres. Otra característica de las flores de *V. meridionale* encontradas en dos poblaciones de Cundinamarca y Boyacá fue el registro de flores morfológicamente hermafroditas, pero funcionalmente femeninas, es decir, con esterilidad masculina, lo que indica que esta especie busca disminuir la autogamia. Por lo general, la floración se da entre los meses de enero a marzo y de junio a agosto (Chamorro y Nates-Parra, 2015).

Fruto y semilla: El fruto de esta planta es una baya, denominado de diferentes formas en algunas zonas como, por ejemplo “guarapita” en la Sierra Nevada de Santa Marta, “mortiño” en Antioquia y “agraz” en Santander (Chaparro y Becerra, 1995). Es de forma esférica con coloración verde en estado inmaduro y se torna morado-negro al madurar. El periodo de fructificación se da en los

meses de marzo a mayo y de octubre a diciembre. Proviene de un ovario ínfero y por eso son notables en el ápice los remanentes del cáliz. En caso de presentarlas pueden encontrarse desde 2 a 25 semillas en frutos con diámetro de 8 mm y de 10 a 37 semillas en frutos de 10 - 12 mm (Valencia y Ramirez, 1993). Recientemente, se han realizado otros estudios enfocados a la propagación sexual de las plantas para evitar la pérdida de diversidad, encontrándose que las semillas de estas plantas son de tipo ortodoxo, lo que indica que tienen la capacidad de soportar la deshidratación hasta un 5 % de contenido de humedad y permite que sean conservadas *ex situ* en bancos de germoplasma a bajas temperaturas (Suárez-Ballesteros et al., 2018).

2.3 Tipo de reproducción

Según Torres-Díaz et al., (2011) *V. meridionale* tiene un tiempo prolongado de floración para aumentar la probabilidad de fecundación cruzada dado que aumenta la atracción a polinizadores, aunque también podría incrementarse la geitonogamia. En plantas localizadas en el departamento de Boyacá se observó polinización cruzada, al igual que la producción de frutos y semillas por autogamia y la apomixis, por lo que se concluye que la planta presenta un sistema reproductivo mixto denominado xenogamia facultativa (polinización cruzada y autopolinización) (Chamorro y Nates-Parra, 2015).

2.4 Producción de agraz en Colombia

Colombia tiene las condiciones ambientales para la producción de frutales entre los que se encuentra el agraz. A pesar de ello, no se han aplicado técnicas de cultivo comercial a las plantas de agraz y en efecto, tiene la categoría de fruta orgánica (Arias Pineda, 2017). Por otra parte,

Ligarreto, (2009) propone que se hable de un proceso extractivo antes de hablar de un proceso productivo dado que lo que se comercializa se obtiene de plantas en estado silvestre.

Dicha comercialización se da por pequeños recolectores y comerciantes que lo llevan a plazas, supermercados o empresas procesadoras. En cuanto al precio en el mercado, Ligarreto (2009) expone que la libra se puede encontrar a \$ 18.000 en diferentes tiendas y en algunas plazas de Bogotá a \$ 6.000. Mientras que Arias (2017) muestra que el kilo puede costar 28.000 en Carulla y en este año se puede adquirir por \$ 32.920 (Carulla, 2020). Aunque existen muchos factores que influyen en la fluctuación del precio, estos datos confirman que el agraz puede ser una opción para los agricultores, no sin antes realizar estudios que permitan un proceso de domesticación para el establecimiento de cultivos a nivel comercial.

Respecto a los datos de producción en agraz esta es inexacta dada su categorización como fruta silvestre. Sin embargo, cabe mencionar que la Fundación Agrodiva ha propuesto unos lineamientos para la clasificación de la calidad del agraz en donde exponen características del fruto y buenas prácticas de conservación, cosecha y manejo pos-cosecha que permitan una óptima comercialización (AGRODIVA, 2019).

Según Quevedo (2020) en la literatura científica no hay profundidad en temas económicos, sociales y culturales relacionados al agraz y por ello plantea un enfoque de sistema agroalimentario localizado para este fruto en las provincias de Occidente y Ricaurte de Boyacá. Con esto busca que haya una colaboración de todos los actores que estén involucrados con la producción, para así lograr un crecimiento en conjunto con la conciencia de tener un producto que hace parte de la biodiversidad el cual debe ser aprovechado de manera racional y sostenible.

2.5 Diversidad genética de *Vaccinium meridionale* Sw.

El género *Vaccinium* se encuentra distribuido de manera silvestre en el hemisferio norte en las montañas de Asia tropical y en Centro y Sur América. Siendo el sudeste de Asia, el centro de origen de casi el 40 % de las especies; 35 % son nativas de América, siendo 25 % de América del norte y 10 % de América Central y del Sur. Las especies restantes se encuentran dispersas por todo el mundo. En cuanto al número de ploidía en las especies de agraz varía de 2x a 4x, 5x y 6x, la poliploidia es más frecuente en especies que son cultivadas (Song y Hancock, 2011). Gracias a un estudio reciente se logró determinar que la ploidía de *V. meridionale* es de 4X (Ehlenfeldt y Luteyn, 2021).

Para la especie *Vaccinium meridionale* no se ha desarrollado ningún trabajo sobre diversidad genética, pero sí para la especie relacionada *V. floribundum* usando marcadores moleculares microsátélites desarrollados para la especie *V. corymbosum* por Boches et al., (2005). En Ecuador, Cobo et al., (2016) evaluaron la diversidad de 126 plantas de *V. floribundum* ubicadas en tres localidades de la zona norte del país. Solo las plantas de una de las tres regiones presentaron un déficit de heterocigotos notable, también fue evidente una diferenciación entre las poblaciones a medida que incrementaba la distancia geográfica y se encontró de dos a tres alelos por cada marcador. En Santander, Colombia se desarrolló una evaluación preliminar de la diversidad genética de *V. floribundum* también en tres localidades, en los siete marcadores microsátélites evaluados se encontraron desde 4 a 9 alelos, lo que según los autores puede dar indicio de variabilidad (Mojica, 2019).

2.6 Códigos de barras de ADN

Los códigos de barras de ADN son secuencias que permiten la identificación de especies utilizando una base de datos de secuencias estandarizadas (Paz et al., 2011). Desde su creación estos han sido mostrados como metodología de identificación y de descubrimiento de nuevas especies o de especies crípticas. Esto es posible gracias a que el código se desarrolla para distinguir la variación interespecífica y la intraespecífica, por lo cual el muestreo debe ser de individuos de la misma especie provenientes de diferentes rangos según su distribución y de individuos de especies relacionadas (Meyer y Paulay, 2005).

En plantas los códigos de barras pertenecen a regiones plastídicas (matK y rbcL) ya que se ha demostrado que se presenta mayor variabilidad en estas regiones, además han sido utilizadas ampliamente en estudios filogenéticos y por lo tanto hay disponibilidad en las bases de datos. Sin embargo, en algunos casos para diferenciar especies cercanas estas combinaciones de marcadores no han sido suficientes y por eso se propuso la utilización de otras regiones como psbA-trnH, el intron trnL y la región nuclear ITS (Paz et al., 2011). También se han descubierto regiones del gen plastidial ycf1 que son altamente variables en las plantas con flores por lo que ha sido empleado en estudios de sistemática molecular (Dong et al., 2015).

El obtener secuencias de estas regiones ha servido para el desarrollo de investigaciones como la dispersión de Vaccinieae, donde se encuentra el género *Vaccinium*, esta tribu al ser un grupo de plantas cosmopolita fue útil para identificar los eventos de dispersión intercontinental con lo que se estableció que el posible centro de origen de la tribu fue en América del Norte y que *V. meridionale* se estableció hace un millón de años en América del Sur (Matuszak, 2015). Gracias

al uso de cebadores para las regiones ITS, matk y rbcL y la caracterización morfológica se pudo determinar la presencia de la especie *V. meridionale* en los Andes del Perú, distribuida entre los 2000 a 2800 m.s.n.m. Los investigadores reportan que *V. meridionale* comparte ecológicamente el mismo hábitat y coexiste con las especies *Cavendishia punctata*, *Disterigma synanthum*, *Gaultheria secunda*, *V. floribundum* y *V. mathewsii* (Tineo et al. 2022). Otros estudios han sido enfocados en establecer las posibles relaciones filogenéticas del género *Vaccinium* y otras Ericaceae (Kron et al., 2002).

En el BOLDSYSTEMS del género *Vaccinium* hay 454 secuencias reportadas, provenientes de 30 países, siendo la mayoría de Canadá. La especie con mayor reporte es *Vaccinium uliginosum* (71) seguida de *Vaccinium vitis idea* (35). De las especies reportadas en Colombia, para *Vaccinium meridionale* se cuenta con secuencias de las regiones matK y rbcL, de *Vaccinium floribundum* se cuenta con una secuencia de matK, y para las especies *Vaccinium aristatum*, *Vaccinium corymbodendrom* y *Vaccinium singularis* no se encuentran secuencias (Boldsystems, 2022).

3. Variabilidad morfológica de *Vaccinium meridionale* Sw. en el departamento de Santander.

3.1 Metodología

Considerando que las especies *V. floribundum* y *V. meridionale* son conocidas por el mismo nombre común (agraz, mortiño, vichachá), fue necesario que el guía reconociera de manera clara la especie que se estaba buscando, por esta razón se hizo un trabajo previo para establecer las diferencias entre las dos especies. Teniendo en cuenta esta información, se definieron los puntos de muestreo donde podrían recolectarse las plantas, según el conocimiento del guía y habitantes de la zona.

De esta manera, las plantas fueron evaluadas en cinco localidades de la Cordillera Oriental de Colombia, dentro de los límites políticos del departamento de Santander. Tres localidades en el municipio de California en las veredas Pantanos, Angosturas y La Baja, y dos localidades en el municipio de Vetas en las veredas Móngora y La Chorrera. Las plantas fueron georreferenciadas con el sistema WGS84. En cada localidad se evaluaron 10 plantas para un total de 50 individuos, con una distancia mínima entre plantas de 30 metros, teniendo en cuenta lo reportado en estudios de diversidad para especies del mismo género con el fin de minimizar el muestreo de individuos clonales, además de ser definido también por las condiciones geográficas y de distribución de las plantas (Bjedov et al. 2015; Galíte et al. 2020). Cada planta fue etiquetada con un código.

Para determinar la variabilidad morfológica, de los descriptores varietales propuestos por Ligarreto et al (2011) y Medina (2010) se seleccionaron 14 variables cualitativas y 7 cuantitativas, y se evaluaron de manera parcial o total en las plantas muestreadas dependió del estado fenológico de las mismas (Tabla 1). La altura de la planta se midió con una cinta métrica. Sin embargo, medidas superiores a 2 metros no se realizaron y se dio una aproximación de esta. Para tomar las mediciones de las flores y frutos (si estaban presentes) se utilizó un calibrador digital. Los datos

obtenidos fueron registrados en hojas de cálculo, para su posterior análisis. Para las variables cualitativas se presentó la frecuencia de cada carácter. En cuanto a las variables cuantitativas se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación, así como también el rango en cada carácter. Con todos los datos cuantitativos, excepto los referentes al fruto por la alta cantidad de datos faltantes se utilizaron en el análisis de componentes principales (PCA) para detectar el descriptor o descriptores que explican el mayor porcentaje de variación con el uso del paquete Ade4. En este gráfico se incluyó la elevación (msnm) en la que se encontraron las plantas con el fin de detectar alguna relación o patrón con los descriptores. Finalmente se realizó un análisis de conglomerados utilizando las variables cualitativas y cuantitativas con el coeficiente de similitud de Gower con la función `gowdis` del paquete `FD` que calcula el coeficiente de similaridad que después convierte a coeficiente de disimilaridad. Todos los análisis se realizaron en el programa R (R Core Team, 2019).

Tabla 1 Descriptores varietales de *V. meridionale* para la evaluación de diversidad morfológica propuestos por Ligarreto et al., (2011) y Medina et al., (2010).

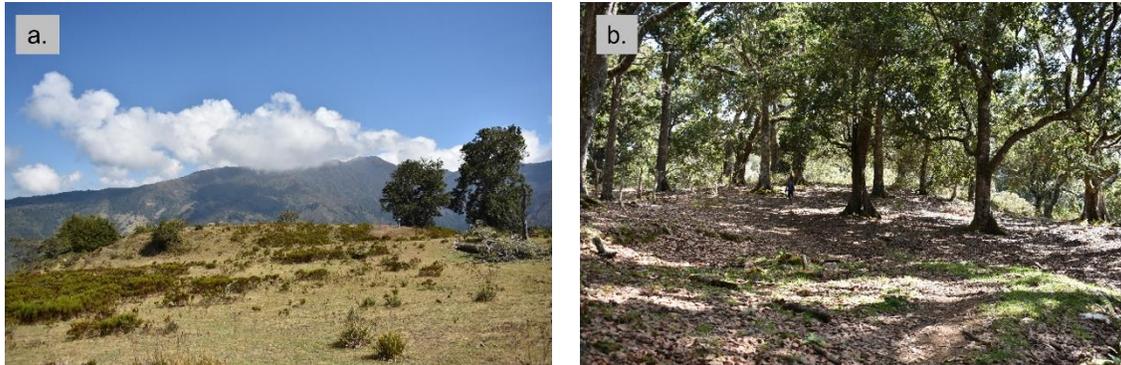
Variable	Descripción
Cualitativas	
Hábito de crecimiento	1. Postrado, 2. Intermedio, 3. Erecto
Densidad de ramificación	1. Baja, no ramas 2. Intermedia, 1 o 2 órdenes de ramificación 3. Alta, 3 o 4 órdenes de ramificación
Pubescencia de ramas	1. Ausente 2. Bajo 3. Abundante
Antocianina en ramas	1. Ausente, 2. Bajo, 3. Medio, 4. Alto
Inserción del pecíolo	1. Nivelado, 2. Ligeramente hundido
Antocianinas en el margen foliar	1. Ausente, márgenes verdes, 2. presente, márgenes marrones
Forma de la lámina foliar	1. Elíptico, 2. Ovado, 3. Lanceolado, 4. Ovalado, 5. Oblongo-lanceolado
Forma margen foliar	1. Serrado, número de puntos >12/cm 2. Serrulado, número de puntos de 12-6/cm 3. Crenado, número de puntos <6/cm
Forma base foliar	1. Cuneada 2. Redondeada

Variable	Descripción
Forma ápice foliar	1. Acuminado, 2. Agudo, 3. Aristado, 4. Obtuso
Forma de los frutos	1. Redonda, 2. Completamente esférico, 3. Achatado, 4. Otro
Cera en la epidermis del fruto	0. Ausente, 1. Presente
Color de los frutos	1. Azul, 2. Morado, 3. Violeta oscuro
Persistencia de los sépalos al madurar	1. Ausente 2. Presente
Cuantitativas	
Altura de la planta	Desde el nivel del suelo y el punto más alto de un brote ortotrópico principal. Dada en centímetros.
Diámetro basal del tallo	Dado en centímetros y medido a ras del suelo, sobre el tallo principal
Longitud hoja (cm)	Promedio, dado en centímetros, de la longitud de 5 hojas, de la parte media de la rama
Ancho de hoja (cm)	Promedio, dado en centímetros, del ancho de 5 hojas, de la parte media de la rama
Número de hojas	Número de hojas en 10 cm de rama
Longitud del fruto (cm)	En 5 frutos por planta
Ancho del fruto (cm)	En 5 frutos por planta

3.2 Resultados

Las plantas de agraz se encontraron en el rango altitudinal de 2249 a 2938 m s.n.m, en sitios expuestos a la luz solar, con poca vegetación alrededor y suelo descubierto; así como bajo la sombra de robledales (*Quercus humboldtii* Bonpl.), con abundante hojarasca en suelo (Figura 1).

Figura 1 Paisajes de la vereda Móngora a) zona con poca vegetación y expuesta a la luz solar y b) zona cubierta por robles



En cuanto a las características vegetativas, la mayoría de las plantas presentaron porte erecto, todas las plantas presentaron alta densidad de ramificación, inserción del peciolo nivelado, ausencia de antocianinas en el margen foliar, margen foliar crenado y base foliar acuminado. Los frutos observados presentaron un color violeta oscuro y no presentaron sépalos. En cuanto a la forma de los frutos estos eran redondos y con presencia de cera en la epidermis. En la Tabla 2 se muestran las frecuencias de cada variable.

Tabla 2 Frecuencias de variables cualitativas registradas en plantas de *V. meridionale* en Santander

Variable	Tipo	Frecuencia
Porte de la planta	Postrado	0
	Intermedio	18
	Erecto	32
Densidad de ramificación	Baja	0
	Intermedia	4
	Alta	46
Pubescencia en rama	Bajo	25
	Abundante	25
Antocianina en rama	Bajo	22
	Medio	26
	Alto	2
Inserción del peciolo	Nivelado	50

Variable	Tipo	Frecuencia
Antocianina en margen foliar	Ausente	50
Forma lámina foliar	Elíptico	32
	Lanceolado	1
	Oblongo	8
	Ovado	1
Margen foliar	Ovalado	8
	Crenado	50
	Cuneado	50
Ápice foliar	Acuminado	13
	Agudo	36
	Obtuso	1
Cera en la epidermis del fruto	Presente	5
Color de frutos	Violeta oscuro	5
Persistencia de los sépalos al madurar	Ausente	5

De las 50 plantas muestreadas, solamente 5 estaban en estado reproductivo, por lo que se logró determinar las variables correspondientes de flor y fruto. El resto de las plantas muestreadas no presentaban flores ni frutos o estos eran insuficientes y dispersos. Los frutos maduros tuvieron una longitud media de 7.54 mm y ancho de 8.12 mm (Tabla 2).

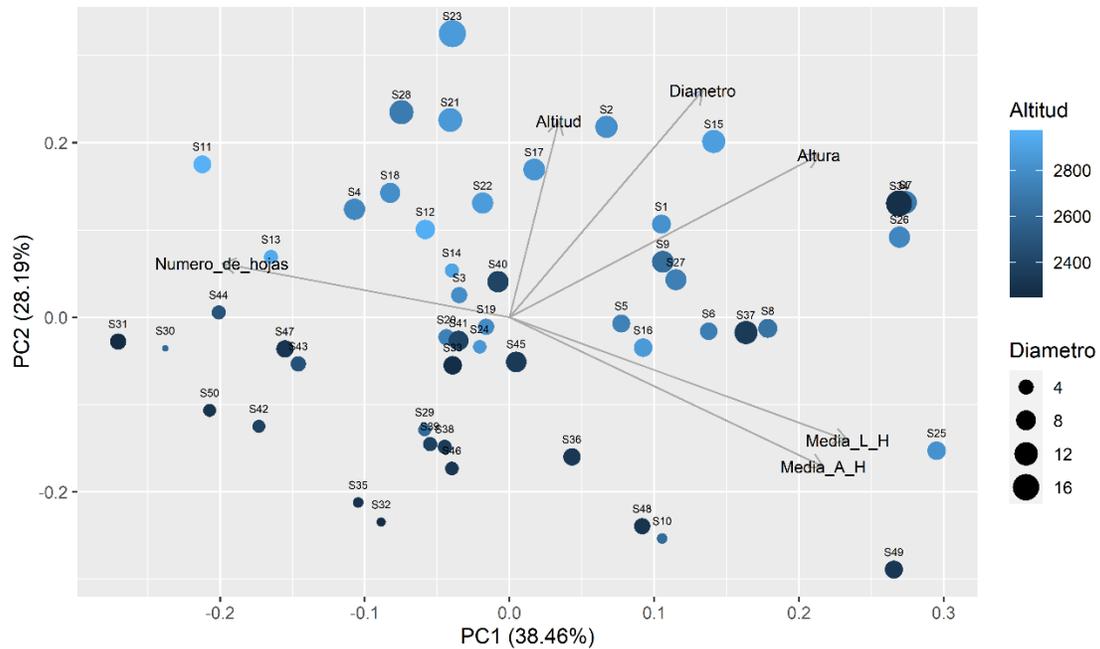
La planta de mayor altura fue de aproximadamente 7 m, con un diámetro de tallo de 16.87 cm, y la de menor altura fue de 0.6 m con un diámetro de tallo de 1.27 cm. Estas dos variables presentaron el mayor coeficiente de variación, lo que indica una amplia dispersión de los datos. Respecto al número de hojas en rama osciló de 6 hasta 28 hojas, dependiendo de su longitud y ancho (Tabla 3).

Tabla 3 Estadística descriptiva de 7 variables cuantitativas registradas en plantas de *V. meridionale* en Santander

Variable	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Valor mínimo	Valor máximo
Longitud de la hoja (cm)	2.44	0.47	19.31	1.59	3.71
Ancho de la hoja (cm)	0.89	0.17	19.34	0.58	1.37
Altura m	2.70	1.51	55.84	0.6	7
Diámetro basal del tallo (cm)	6.77	3.62	31.83	1.27	16.87
Número de hojas en 10 cm de rama	18.24	4.36	23.91	6	28
Longitud del fruto (mm)	7.54	0.88	8.54	6.57	8.41
Ancho del fruto (mm)	8.12	0.73	11.13	7.28	9.16

Al realizar el PCA los dos primeros componentes principales explicaron el 67 % de la varianza (Figura 2). Se observó que las variables de media de longitud de la hoja y media del ancho de la hoja más información al primer componente principal con un 27 % y 22 %, respectivamente. Las características de diámetro y número de hojas con un 32 % y 24 %, respectivamente de aporte al segundo componente principal. La mayor longitud de hoja (3.07 cm) correspondió a la planta S25 muestreada en el municipio de California, vereda de La Baja, localidad 4 y en esta misma vereda se encontró la longitud de hoja mínima (1.59 cm) en la planta S31 ubicada en la localidad 3.

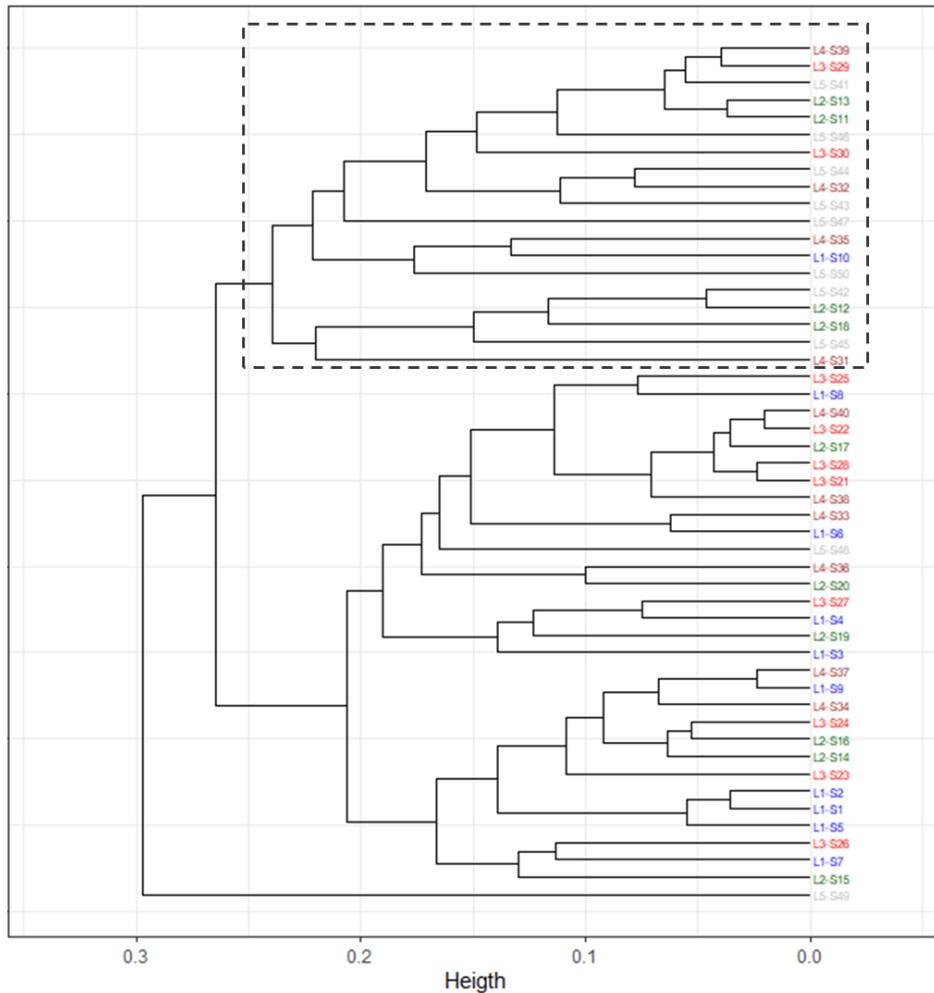
Figura 2 Biplot del primer y segundo componente principal de 5 características cuantitativas de 50 plantas silvestres de *V. meridionale* muestreadas en Santander



Nota: Abreviaciones: Media_L_H: media de longitud de las hojas, media_A_H: media del ancho de las hojas. Los códigos pertenecen al número de las plantas relacionadas a las localidades de Santander en el Apéndice A.

Al realizar el análisis de conglomerados mediante la inclusión de variables cualitativas y cuantitativas, en el fenograma es evidente que la mayoría de las plantas muestreadas en la localidad de la vereda La Chorrera -Vetas se encuentra en un solo grupo junto con algunas plantas de la localidad tres de la vereda de Móngora – Vetas, y otro conformado por las plantas de las demás localidades (Figura 3).

Figura 3 Fenograma con características morfológicas de plantas de *Vaccinium meridionale* muestreadas en el departamento de Santander



Nota: En el recuadro de líneas con guiones se destaca el grupo conformado por la mayoría de las plantas de la localidad 5, vereda La Chorrera del municipio de Vetás.

3.3 Discusión

Según Luteyn (2002), las especies de ericáceas se encuentran en hábitats montañosos, geológicamente jóvenes y con poca intervención antropogénica lo que se pudo constatar en las zonas de muestreo, en donde los fragmentos de bosque con poca intervención fueron lugares propicios donde se encontraron plantas de *V. meridionale*.

Respecto a la distribución de las plantas se encontró un mayor número de estas en las localidades ubicadas a mayor altura (2600-2973). Además, en pequeños tramos de terreno se observaron grupos de individuos (*ramets*) a partir de reproducción vegetativa (rizomas), conocidos como (*genet*) (Chamorro y Nates-Parra, 2015).

En cuanto a la exposición solar, se encontraron plantas completamente expuestas al sol en campo abierto, así como también plantas al borde del fragmento de bosque o bajo sombra de robledales u otros árboles. De manera general, en plantas con baja exposición solar, no se observó el estado reproductivo, y según lo manifestaron los habitantes de la zona, estos individuos tardaban años para dar cosecha. Esta situación es similar a la evidenciada por Rodríguez y Morales (2015) quienes evaluaron el desarrollo de los frutos de *Vaccinium corymbosum* L. bajo cuatro tipos de malla que proporcionaban diferentes niveles de sombra y lo compararon con el control (sin malla). En ese estudio la sombra generada por las mallas prolongó las fases fenológicas de las plantas, retardando así la maduración de los frutos. Igualmente, en el crecimiento bajo sombra de genotipos de la especie *Vaccinium vitis-idaea* L. la luz influyó en rasgos como la altura de la planta, longitud y número de brotes vegetativos y fértiles, siendo el factor que potenciaba la producción de brotes fértiles (Hjalmarsson y Ortiz, 1998). Así mismo, *Vaccinium hirtum* presenta una mayor intensidad de floración a mayores niveles de luz (Kawamura y Takeda, 2002).

Según los habitantes de las zonas de muestreo, en algunos años no se dan las condiciones climáticas adecuadas para la floración y fructificación del agraz. Por ejemplo, en el año 2020 se presentó un periodo prolongado de sequía (Gobernación de Santander, 2020), lo que pudo ocasionar un marchitamiento de las flores. Esto se constató al realizar las visitas a los sitios de muestreo donde se confirmó la ausencia de floración y fructificación a pesar de que para las fechas de las visitas (noviembre, marzo) según los recolectores del fruto se realizaba la cosecha. Vale la

pena mencionar que, en el año 2022, se han realizado algunas visitas a otros sitios (datos no mostrados), en los cuales la alta frecuencia de lluvias en el periodo de floración ha causado el desprendimiento de las flores impidiendo de esta manera la formación de los frutos.

Por otra parte, la alta variación en la altura de la planta y diámetro del tallo coincide con lo obtenido por Ligarreto et al., (2011), al evaluar poblaciones naturales en diferentes regiones de Colombia. Esto se explica puesto que al ser plantas silvestres presentan una edad diferente, la cual no se puede determinar. Sumado a esto, otras características del sitio donde éstas habitan, puede influir en su crecimiento como la exposición a la luz solar, disponibilidad de agua e incluso las podas que pueden haber sido realizadas en algunos individuos.

A pesar de la cantidad de frutos obtenidos en los muestreos (Tabla 2), la media de la longitud y el ancho de los frutos que se encontraron fue similar a la reportada por (Medina et al., 2009) y Ligarreto et al., (2011) con porcentajes de variación bajos al igual que la longitud y ancho de las hojas (Tabla 2).

En cuanto al diámetro del tallo en el estudio realizado por Medina et al., (2009) no se reporta esta variable, pero si es registrado por en el estudio de Ligarreto et al., (2011) cuyos valores máximos y mínimos coinciden con los encontrados en este estudio. No obstante, la media reportada fue menor a la obtenida para las muestras de Santander lo que indica un mayor crecimiento o mayor edad de las plantas registradas en el presente estudio, lo que podría estar asociado a la dificultad de acceder a algunas de estas plantas al encontrarse en las zonas altas de las montañas.

4. Diversidad y estructura genética de *Vaccinium meridionale* mediante marcadores moleculares tipo microsatélite

4.1 Metodología

Recolección del material vegetal

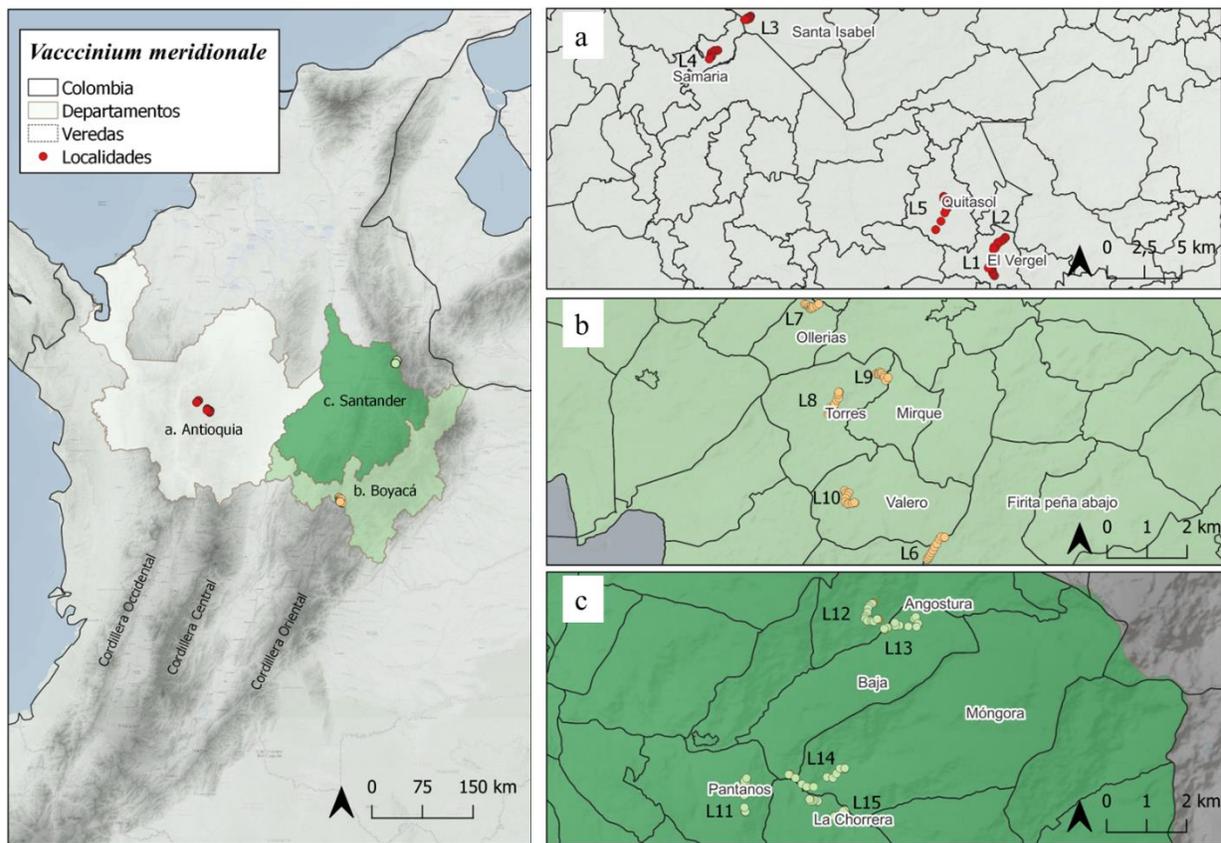
Los sitios de muestreo se seleccionaron teniendo en cuenta el estudio realizado por Medina *et al.*, (2010), reportes de herbarios en el SIB (Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia) y comunicación con personal de UMATAS o residentes de algunos municipios. De esta manera, en los departamentos de Santander, Antioquia y Boyacá se seleccionaron cinco localidades para un total de 15 puntos de muestreo. En cada sitio se recolectaron hojas (en lo posible jóvenes) de 10 plantas manteniendo una distancia mínima de 30 metros (Gailite *et al.*, 2020; Bhatt y Debnath 2021) para un total de 150 muestras (Figura 4). Estas se depositaron en bolsas de papel debidamente rotuladas con el código de muestra y se mantuvieron en bolsas resellables con gel de sílice atendiendo el protocolo dado por González y Quintero (2017), para su procesamiento en Laboratorio de Genética y Biotecnología de la Universidad Industrial de Santander.

Extracción de ADN

Se realizó la maceración del tejido con nitrógeno líquido y se almacenó a -20° C. Se tenía establecido utilizar el protocolo de extracción de ADN de Doyle, (1991) modificado por Mojica (2019). Sin embargo, al no observar resultados positivos se ensayaron otros protocolos: SDS (Alexander *et al.*, 2006), Ivannova (2018), CTAB modificado por Azmat *et al.*, (2012), además, se utilizaron los kit de extracción HP Plant DNA mini kit y el Dneasy plant mini kit de QIAGEN; con seis muestras cada uno. La extracción de cada protocolo se visualizó en geles de agarosa al 1

%. De acuerdo con la disponibilidad del equipo se realizó la cuantificación con Nanodrop One de Thermo Scientific.

Figura 4 Distribución geográfica de las localidades de muestreo en a) Antioquia b) Boyacá y c) Santander



Nota: en la Cordillera Central las localidades de muestreo L1 a L5 en el departamento de Antioquia, en la Cordillera Oriental de L6 a L10 en el departamento de Boyacá y de L11 a L15 en el departamento de Santander.

Amplificación de los marcadores microsatélites

Para determinar la diversidad genética y estructura poblacional de *V. meridionale* proveniente de localidades de la Cordillera Central y Oriental de Colombia se evaluaron en total de 20 marcadores heterólogos, correspondientes a 7 marcadores moleculares tipo microsatélite

desarrollados por Boches et al. (2005) para *V. corymbosum* y 13 marcadores reportados por Argudo, (2017) para *V. floribundum* (Tabla 4). Inicialmente se amplificaron con las condiciones reportadas en la literatura. De manera preliminar, estos se probaron en un set de 3 muestras (S9, S10 y S12) con reacciones de PCR de 10 ul con concentraciones de cebador de 0.4 uM, 2,5 ul de ADN (2.6 ng/ul~5 ng/ul) y 5 ul de Go taq green master mix (Promega). Dependiendo del amplicon obtenido se realizaron modificaciones teniendo en cuenta el gradiente de temperatura de hibridación y la concentración del cebador, cloruro de Magnesio o ADN.

Tabla 4 Lista de marcadores microsatélites para la evaluación de la diversidad genética de *V. meridionale* con el número de alelos (Na) y temperatura de hibridación (Ta).

Marcador	Secuencia	Motivo	Tamaño	Na	Ta
CA794F*	F CGGTTGTCCCACCTTCATCTT R GTTTGAATTTGGCTTCGGATTC	GA (12)	224-255	10	60
NA800*	F CAATCCATTCCAAGCATGTG R GTTTCCCTAGACCAGTGCCACTTA	TC (13)	196-216	31	60
NA1040*	F GCAACTCCCAGACTTTCTCC R GTTTAGTCAGCAGGGTGCACAA	TC (11)	186-255	15	60
VCC_I2*	F AGGCGTTTTTGAGGCTAACA R TAAAAGTTCGGCTCGTTTGC	CT (14)	200-275	10	62
VCC_K4*	F CCTCCACCCCACTTTCATTA R GCACACAGGTCCAGTTTTTG	TC (16) TC (12)	150-300	14	62
VCC_S10*	F ATTTGGTGTGAAACCCCTGA R GTTTGC GGCTATATCCGTGTTTGT	CT (22)	200-300	29	60
NA398*	F TCCTTGCTCCAGTCCATGC R GTTTCCTTCCACTCCAAGATGC	AAAT (5)	210-240	5	56
M001**	F AACCTGTACAAGTCTACCCCTACCG R TAATAACAGAACATCAGTGCAAGGG	TTCCTG (48)	327-369	8	58
M002**	F CAAAATAACCCTCAAACACACACC R TTTATCATTATCCTACAGCGTCACC	TTTCG (50)	158-163	3	58
M007**	F GAAGCCTGGTCAGTCCTTTCC R CACTAGGAGTCTGACTTTCCTCTGC	TGC (24)	285-294	3	63
M008**	F ACTACCCTGCCACTCTCACTACC R CGGACCCAGAGTTAGGATAATACC	ACC (27)	336-366	8	63
M009**	F TATTCTTATGTTCGTCCTCGTAGGC R TTTCTGCTAGCTGTTGTTGTAACG	AGT (24)	402-408	3	63
M010**	F TAGACAACCACTTTCTTTGGTTTCC R AATAAGTCTTGCTTTGTACCTTGCC	TTC (30)	292-307	6	63
M011**	F GCGAGAGTATTGGTGTTCATGC R CAGGTATAGATATACTGGGTTTTGAGG	TTC (24)	292-307	10	58
M015**	F TAAATCCAAAAGGACAACCTCCATCC R AACATGGGTTTAGCGTAGGAGACG	TTC (27)	211-303	10	60
M016**	F GAAGAAGAAATGGTGAGACAACCTGC R AAGAAGATTGACTAGGGAGACATCG	TTC (33)	410-422	7	60
M018**	F ATTCGGGTATGGAGAGAGAAAGAGG	TCC (27)	211-324	11	60

Marcador	Secuencia	Motivo	Tamaño	Na	Ta
M020**	R ACACCAACAAACCCGAAAATAACC	ATT (33)	279-340	12	60
	F CTACATTTTACCCGGTCACTTTTGC				
	R CACACTAGTTACAAGAGCATTTC				
M021**	F CATGGTTTGGTCTAGTTGATAACCC	TTC (33)	306-365	14	60
	R GATGCTTCCTAGAGCCTTTATTGC				
	F TGTTGCTTCTTTTGTTCCTACCC				
M024**	R TTAGAGTTCTAAGCCAACAACTCG	ATC (24)	354-372	8	60

* Marcadores moleculares desarrollados para *V. corymbosum* (Boches et al., 2005)

** Marcadores moleculares desarrollados para *V. floribundum* (Argudo et al., 2017)

Electroforesis y visualización en gel de poliacrilamida

La visualización del producto amplificado se realizó en geles de poliacrilamida 19:1 al 6 %, 250 ul de persulfato de amonio [10 %] y 50 ul de TEMED. La electroforesis se corrió en cámara vertical a 80 voltios por 30 minutos, 120 voltios por 2 h y 150 voltios por 30 minutos. En cada gel se sirvieron 2 ul de Ladder 100 pb Opti-DNA Marker (abm) en el primer pozo y 5 ul del producto de PCR de cada muestra. El procedimiento de revelado fue de 5 minutos en solución fijadora (2.1 ml de ácido acético glacial, 30 ml de etanol, 270 ml de agua destilada), 7 minutos en solución de tinción (0.2 g de nitrato de plata, 200 ml de agua destilada) enjuague con agua destilada y 7 minutos en solución de revelado (4.5 g de hidróxido de sodio, 900 ul de formaldehido, 250 ml de agua destilada) (Cobo, 2014). Después, los geles se dispusieron sobre un transiluminador de luz blanca (Cleaver) para tomar la fotografía.

Las fotografías se analizaron en el programa LabImage 1D (KapelanBio) para calcular el tamaño en pb del amplificado y determinar los alelos presentes en cada set de muestras. Los datos fueron tabulados en Excel donde las filas correspondieron a las muestras y las columnas a los alelos identificados para cada marcador. La matriz se transformó a un formato de texto y se

procedió a generar los archivos en el programa Convert (Glaubitz, 2004) para los análisis en Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010) y Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).

Análisis de diversidad genética

Para verificar la posibilidad de alelos nulos por cada marcador se analizó la matriz en Micro-checker (Van Oosterhout et al. 2004). Para cada marcador se evaluó el test de equilibrio de Hardy-Weinberg con la prueba exacta de Fisher implementada en Arlequin (Excoffier y Lischer 2010). Todas las evaluaciones consistieron en 9999999 cadenas de Markov y 100000 pasos desmemorización. Se evaluaron las frecuencias alélicas, número de alelos, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada e índice de fijación de los genotipos detectados para las 15 localidades con el programa GenAlEx (Peakall y Smouse, 2012). El contenido de información polimórfica (PIC) de cada marcador fue calculado en el programa Cervus (Marchall et al., 1998). El grado de diferenciación entre las 15 localidades y entre los departamentos se evaluó por medio del F_{ST} con el máximo número de permutaciones que el programa Arlequin permite.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) se realizó para determinar la variación intrapoblacional e interpoblacional en el programa Arlequin (Excoffier y Lischer 2010). Una prueba de Mantel con 9999 permutaciones se desarrolló en GenAlex (Peakall y Smouse, 2012) con el fin de establecer si existe una correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética de los individuos de las diferentes localidades.

Estructura genética

Para evaluar la estructura poblacional se realizó en el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000) un análisis bayesiano con modelo “Admixture” para establecer el número de poblaciones (K) apropiado entre 1 y 15 con 10 repeticiones independientes por cada valor de K. El periodo de *burn-in* fue de 100,000 pasos seguido de 1,000,000 de cadenas de Markov Monte Carlo. Se utilizó el delta de K (ΔK) para determinar el mejor valor de K usando el programa en línea Structure Harvester (Evanno *et al.*, 2005). Después se procedió a realizar la corrida de los datos con el mejor valor de K obtenido del paso anterior con el mismo periodo de *burn-in* y cadenas de Markov Monte Carlo (Vega-Polo *et al.*, 2020).

4.2 Resultados

4.2.1 Muestreo y extracción de ADN

En total se genotiparon 149 individuos de *V. meridionale* puesto que un individuo recolectado en el departamento de Antioquia no correspondió a la especie. El rango altitudinal donde se encontraron los individuos en Antioquia fue de 2615 a 2816 m s.n.m., en Boyacá fue de 2412 a 2986 m s.n.m y en Santander de 2249 a 2973 m s.n.m (Tabla 5).

Tabla 5 Localidades de muestreo de *V. meridionale* en la Cordillera Central y Oriental de Colombia

Departamento	Municipio	Vereda	Localidad	Código de recolección	Altitud
Antioquia*	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A1 - A10	2615 - 2655
Antioquia*	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A11 - A19	2623 - 2631
Antioquia*	Yarumal	Santa Isabel	L3	A20 - A29	2768 - 2816
Antioquia*	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A30 - A39	2660 - 2720
Antioquia*	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A40 - A49	2659 - 2692
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B1 - B10	2893 - 2986
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B11 - B20	2412 - 2433
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B21 - B30	2632 - 2670
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B31 - B40	2451 - 2518
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B41 - B50	2753 - 2799
Santander	California	Pantanos	L11	S1 - S10	2616- 2819
Santander	California	Angostura	L12	S11 - S20	2733 - 2973
Santander	California	Baja	L13	S21 - S30	2606 - 2869
Santander	Vetas	Móngora	L14	S31 - S40	2249 - 2398
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S41 - S50	2300 - 2495

Nota: Las localidades con asterisco (*) se encuentran en la Cordillera Central de Colombia, las localidades sin asterisco se encuentran en la Cordillera Oriental.

De los múltiples protocolos de extracción de ADN evaluados y después de un número considerable de modificaciones, con el protocolo Doyle (1991) y Azmat et al., (2012) se logró obtener visualización del ADN en gel de agarosa. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios en todas las muestras, por lo que la extracción finalmente se realizó con el DNeasy plant mini kit de Qiagen, logrando concentraciones de ADN en las muestras de 1.6 a 7.8 ng/ul con valores de A260/A280 y A260/A230 por debajo de los óptimos.

4.2.2 Análisis de diversidad

Amplificación de los marcadores microsatélites

De los veinte marcadores heterólogos probados se excluyeron en total diez. Tres por no presentar producto de PCR en alguna de las muestras de prueba (M009, M010, CA794F), seis por no presentar las bandas definidas (M016, M020, M021, M024, VCCI2, NA398) y uno por no evidenciar polimorfismo (M015). Con base en lo descrito, la identificación de alelos y

estimaciones de parámetros poblacionales se realizó con los genotipos detectados con los marcadores: VCC S10, NA1040, NA800, M001, M002, M007, M008, M010, M011 y M018. El producto de PCR de los diez marcadores se obtuvo al modificar la concentración de cebadores (0.4 uM para la mayoría de los marcadores y de 0.2 uM para M001, M011 y M018), además de algunos ajustes en la temperatura de hibridación.

Alelos nulos

En cuanto a la presencia de alelos nulos potenciales fue detectada en común para las muestras procedentes de Antioquia, Boyacá y Santander en los marcadores M001 y M008, con frecuencias de 0.37 y 0.44 respectivamente. Así mismo de manera exclusiva para Santander con M007 y para Antioquia de M010 y M011. La media de la frecuencia de alelos nulos fue de 0.08. De esta manera dado al posible sesgo que podría generar los datos de los marcadores M001 y M008, fueron eliminados al realizar los análisis de diversidad.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los resultados del Test EHW indicaron que los marcadores M002, NA1040 y NA800 se encontraron en equilibrio al considerar las 149 muestras. Al realizar el análisis por cada departamento, el resultado fue consistente para Antioquia, mientras que en Boyacá fueron los marcadores M002, M007, M011, NA1040 y NA800 los que no presentaron desviaciones HW y los marcadores M002, M018 y NA800 en Santander (Apéndice B).

Alelos detectados en los marcadores microsatélites

Un total de 41 alelos se identificaron en las 149 muestras de *V. meridionale*. El número de alelos por locus se estableció entre 3 a 8 con un promedio de 5 alelos. El marcador M002 con un rango de alelos de 110 – 175 pb, con mayor frecuencia (0.76) del alelo 125 pb. El rango de los alelos para el marcador M007 osciló de 240-276 pb, con una mayor frecuencia (0.41) del alelo 261

pb. El marcador M018 con alelos de 147-219 pb con alelo 180 con mayor frecuencia (0.57). El marcador M010 con rango de alelos de 267-288 con mayor frecuencia del alelo 288 con 0.36. El marcador M011 con rango de 288 – 309 pb siendo el más común el alelo 309 con 0.71. Para los marcadores VCC_S10, NA1040 y NA800 el tamaño de los alelos osciló entre 168 a 320 pb con las mayores frecuencias de alelos de 0.28, 0.77 y 0.94 respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6 Frecuencias alélicas observadas para los marcadores microsatélites

Allele/n	VCC_S10	NA1040	NA800	M002	M007	M010	M011	M018
N	145	149	146	148	147	145	146	148
110				0.003				
115				0.166				
125				0.76				
130				0.003				
147								0.007
155				0.054				
168		0.064						
170		0.775						
175				0.014				
180								0.571
186								0.395
202	0.29		0.945					
204		0.02						
206	0.259							
210	0.028		0.014					
218		0.003	0.017					
219								0.027
220		0.044						
224		0.003						
226			0.024					
240					0.054			
255					0.218			
261					0.418			
267						0.348		
270					0.265			
273					0.041			
276					0.003			

279						0.283		
280		0.091						
288						0.369	0.007	
291							0.274	
300	0.148							
304	0.003							
306	0.241							
309	0.024						0.719	
320	0.007							

Polimorfismo de los marcadores

Los marcadores utilizados fueron polimórficos con valor de PIC entre 0.10 a 0.72 con valor promedio de 0.49. Los marcadores con mayor PIC fueron VCC_S10 (0.72) y M007 (0.65), mientras que, los marcadores NA800 (0.10) y M011 (0.33) fueron los menos polimórficos. A nivel de localidades en Antioquia solo la localidad 2 los marcadores M002, M010 y M011 fueron monomórficos. En Boyacá la localidad 6, los marcadores M007, M011 y NA800 fueron monomórficos. También de Boyacá las localidades L8, L9, L10 y las localidades de Santander L11, L12 y L13 presentaron el marcador NA800 como monomórfico.

La heterocigosidad observada (H_o) de los marcadores fue de 0.48, con rango de 0.09 a 0.83. En cuanto a la heterocigosidad esperada (H_e) media de todos los marcadores fue de 0.37, esta se estableció dentro del rango de 0.33 a 0.65 (Tabla 7). El índice de fijación (F) presentó un rango de -0.48 a 0.02, siendo el mayor valor presentado en el marcador M008.

Tabla 7 Índices de diversidad genética en *V. meridionale* evaluada con 8 marcadores tipo microsatélite

Locus	N	Na	EHW	PIC	Ho	He	F
VCC_S10*	145	8	0.00	0.72	0.83	0.65	-0.28
NA1040*	149	7	0.34	0.36	0.44	0.32	-0.27
NA800*	146	4	0.07	0.10	0.09	0.10	-0.004
M002**	148	6	0.06	0.35	0.32	0.32	-0.05
M007**	147	6	0.00	0.65	0.42	0.41	0.02
M010**	145	3	0.00	0.58	0.62	0.40	-0.34
M011**	146	3	0.00	0.33	0.37	0.33	-0.10
M018**	148	4	0.00	0.41	0.72	0.48	-0.48
Media	146.6	5		0.43	0.48 ± 0.03	0.37 ± 0.02	-0.21 ± 0.04

* Marcadores moleculares desarrollados para *V. corymbosum* (Boches et al., 2005)

** Marcadores moleculares desarrollados para *V. floribundum* (Argudo et al., 2017)

Nota: N: Número de individuos, Na: Promedio de número de alelos, EHW: valor de p del Equilibrio de Hardy Weinberg, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, F: Índice de fijación, PIC: Contenido de información polimórfica.

Diversidad genética por departamentos

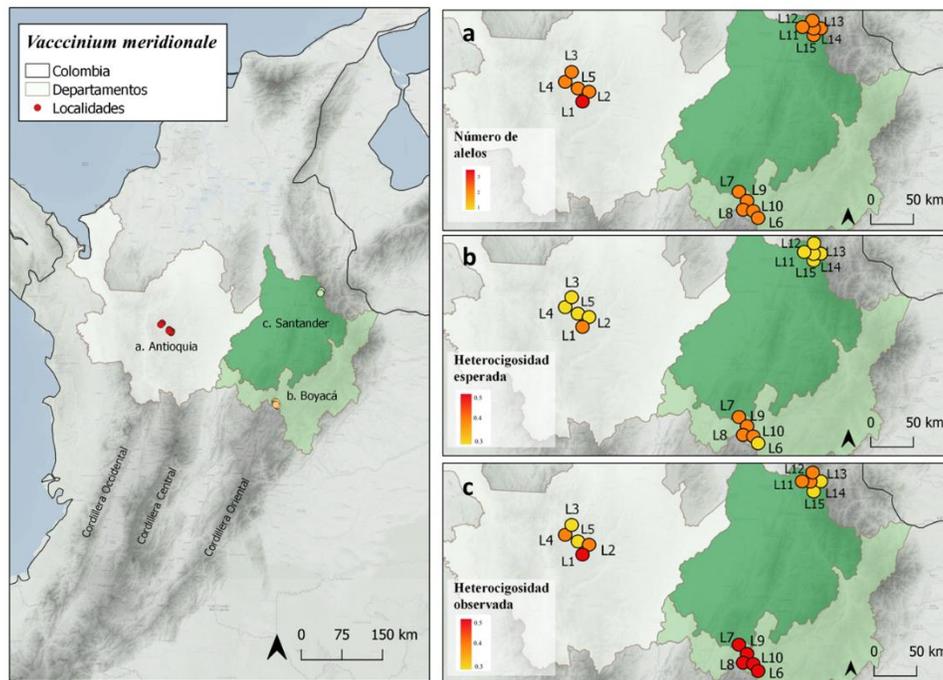
El número de alelos (Na) en las localidades de las tres regiones muestreadas fue en promedio 3, con un máximo de alelos privados $A_p = 2$. Al realizar el análisis de los índices de diversidad por las diferentes localidades muestreadas, L8, L9 y L10 de Boyacá presentaron los valores más altos de heterocigosidad observada (Ho) y los valores más bajos de este parámetro se observaron en las localidades L3, L5 (Antioquia) y L13 (Santander). Respecto a la heterocigosidad esperada (He) las localidades L9, L8 y L1 presentaron los valores más altos y las localidades L2, L3 y L15 los valores más bajos. Se presentaron niveles bajos de endogamia desde $F = -0.38$ (L2) a $F = 0.06$ (L5) (Tabla 8).

Tabla 8 Parámetros de diversidad genética de 149 plantas de *V. meridionale* de tres regiones de la Cordillera Oriental y Central de Colombia

Departamento	Localidad	N	Na	Ho	He	F	% P	Ap
Antioquia*	L1	10	3.12 ± 0.44	0.53 ± 0.12	0.41 ± 0.07	-0.15 ± 0.18	100.00%	2
	L2	9	2.50 ± 0.59	0.42 ± 0.14	0.30 ± 0.09	-0.38 ± 0.08	62.50%	
	L3	10	2.37 ± 0.18	0.37 ± 0.13	0.33 ± 0.07	-0.018 ± 0.08	100.00%	
	L4	10	2.62 ± 0.26	0.42 ± 0.13	0.37 ± 0.06	-0.04 ± 0.22	100.00%	1
	L5	10	2.62 ± 0.26	0.38 ± 0.09	0.39 ± 0.04	0.06 ± 0.16	100.00%	
Boyacá	L6	10	2.50 ± 0.59	0.57 ± 0.17	0.36 ± 0.11	-0.59 ± 0.09	62.50%	1
	L7	10	2.62 ± 0.37	0.53 ± 0.11	0.40 ± 0.07	-0.28 ± 0.13	87.50%	
	L8	10	2.50 ± 0.30	0.64 ± 0.11	0.43 ± 0.07	-0.47 ± 0.13	87.50%	1
	L9	10	2.62 ± 0.46	0.65 ± 0.12	0.44 ± 0.07	-0.30 ± 0.13	87.50%	
	L10	10	2.62 ± 0.46	0.53 ± 0.13	0.40 ± 0.08	-0.08 ± 0.38	87.50%	
Santander	L11	10	2.37 ± 0.32	0.40 ± 0.11	0.35 ± 0.07	-0.08 ± 0.18	87.50%	1
	L12	10	2.25 ± 0.31	0.49 ± 0.11	0.37 ± 0.06	-0.22 ± 0.17	87.50%	
	L13	10	2.37 ± 0.32	0.38 ± 0.13	0.34 ± 0.08	-0.12 ± 0.20	87.50%	1
	L14	10	2.25 ± 0.53	0.45 ± 0.12	0.39 ± 0.08	-0.10 ± 0.16	87.50%	
	L15	10	2.12 ± 0.35	0.39 ± 0.13	0.33 ± 0.09	-0.19 ± 0.22	75.00%	
			2.50 ± 0.09	0.48 ± 0.03	0.37 ± 0.02	-0.21 ± 0.04	90%	

Nota: N: Número de individuos, Na: Promedio de número de alelos, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, F: Índice de fijación, % loci polimórfico, Ap: Alelos privados.

Figura 5 Variación geográfica de parámetros genéticos de *V. meridionale* en Colombia

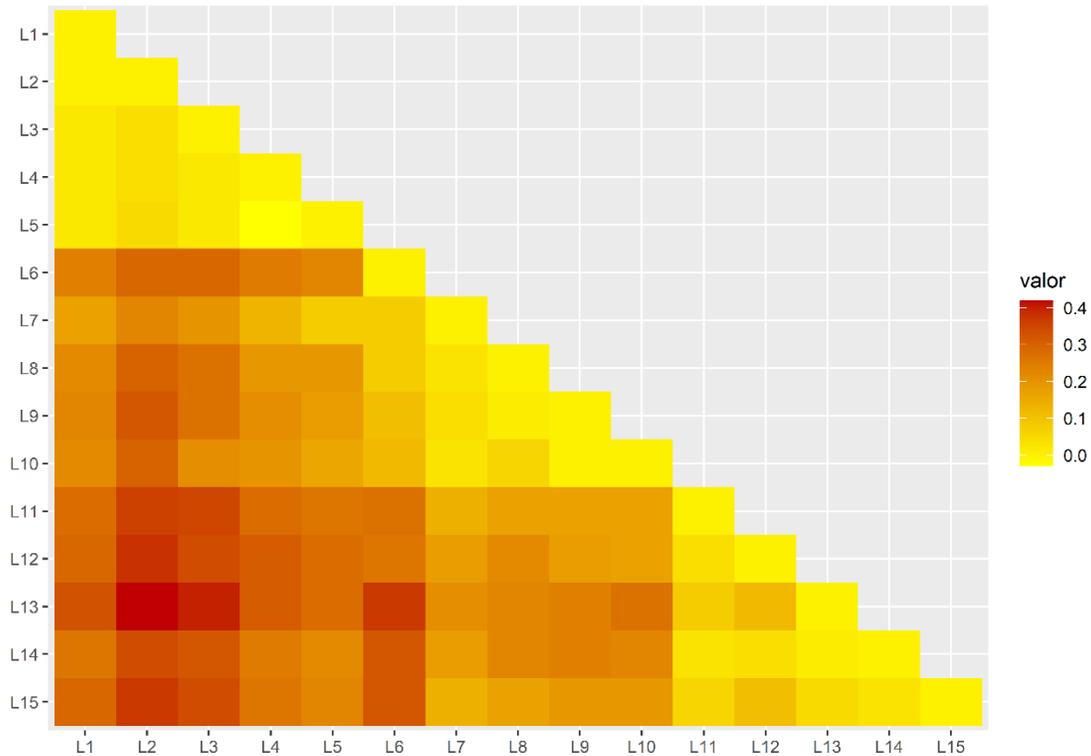


Diferenciación genética

Al agrupar las localidades según los departamentos de procedencia se estimó $F_{ST} = 0.19$ para la pareja Antioquia-Boyacá, $F_{ST} = 0.28$ para la pareja Antioquia-Santander y $F_{ST} = 0.18$ para la pareja Santander-Boyacá, todos con valores de $p = 0.000$ (Tabla 9).

Al realizar la comparación por pares de localidades se obtuvieron valores de F_{ST} desde -0.03 hasta 0.42, mostrando un aumento de la diferenciación entre las localidades de Antioquia (L1 a L5) con Boyacá (L6 a L10) y Antioquia con Santander (L11 a L15) (Figura 6). Entre las localidades de Boyacá y Santander se observó una diferenciación de media a alta con valores de gran diferenciación solo entre la localidad L6 (Boyacá) con todas las localidades de Santander, esto según los rangos establecidos por Wright, de los valores que indican que $F_{ST} < 0.05$ indica poca diferenciación genética, entre $0.05 < F_{ST} < 0.15$ moderada diferenciación, $0.15 < F_{ST} < 0.25$ alta diferenciación y valores de $F_{ST} > 0.25$ indican una gran diferenciación genética (Milgroom, 2017).

Figura 6 Comparación por pares de localidades por medio de F_{ST} de las 15 localidades muestreadas en la cordillera oriental y central de Colombia



Nota: Los colores en la figura representan el grado de diferenciación genética (F_{ST}) entre parejas de localidades (L1 a L15).

Tabla 9 Diferenciación genética F_{ST} por departamentos de recolección y valores de probabilidad (p -value) de la prueba de significancia estadística (arriba de la diagonal)

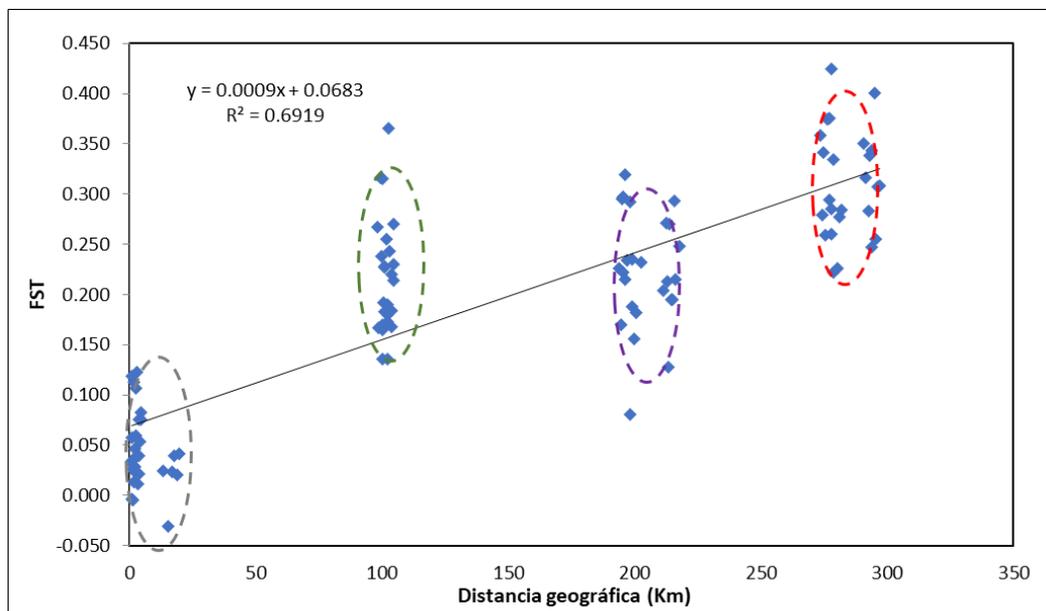
	Antioquia	Boyacá	Santander
Antioquia	0	0.00	0.00
Boyacá	0.19	0	0.00
Santander	0.28	0.18	0

Valor de significancia ($P < 0.05$)

Con la prueba de Mantel ($p=0.000$, $r^2 = 0.69$) se evidenció que la diferenciación observada en las localidades puede ser producto del aislamiento por distancia, demostrado con una correlación significativa entre las matrices de distancia genética con los valores de F_{ST} y distancia

geográfica medida en kilómetros (Figura 7). De las 105 comparaciones realizadas de manera pareada entre las diferentes localidades, el círculo gris corresponde a la agrupación de las localidades dentro de un mismo departamento. El color verde representa la agrupación entre las localidades de Boyacá y Santander a una distancia aproximada de 100 Km. El círculo morado corresponde a la agrupación entre localidades de Antioquia y Boyacá cuando la distancia aproximada era de 200 Km y el último grupo señalado con círculo rojo contiene en su mayoría las localidades de Antioquia y Santander que se agruparon cuando presentaron una distancia aproximada de 300 km. Por lo tanto, la correspondencia de mayor diferenciación a mayor distancia se observó entre las localidades de Antioquia (Cordillera Central) con las de Boyacá y Santander (Cordillera Oriental).

Figura 7 Prueba de Mantel de las 15 localidades muestreadas en la Cordillera Central y Oriental de Colombia



El AMOVA teniendo en cuenta los grupos según los departamentos de procedencia, mostró un 74 % de variación dentro de las localidades y un 3.4% de variación entre las localidades dentro de los

departamentos. En cuanto a los departamentos se presentó un 22 % de variación (Tabla 10). Además, el F_{ST} con un valor de 0.25 indicó de manera significativa ($p < 0.05$) la presencia de estructura.

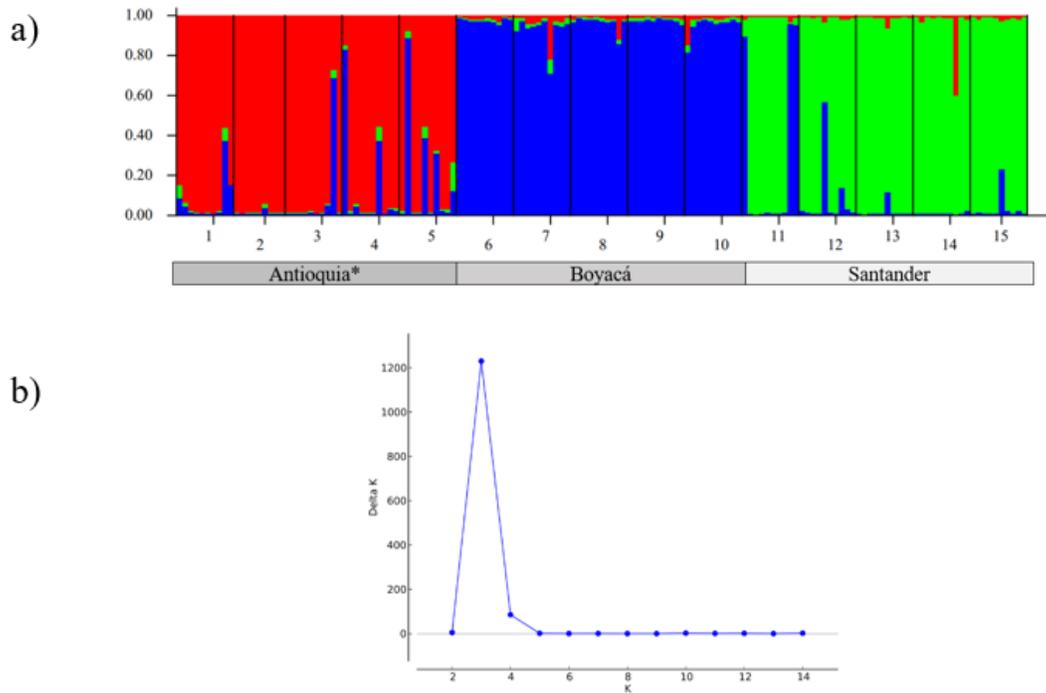
Tabla 10 Análisis molecular de varianza realizado teniendo en cuenta el departamento de procedencia de las muestras

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre departamentos	97.94	0.47	22.04
Entre localidades dentro de los departamentos	36.34	0.07	3.4
Dentro de las localidades	443.88	1.59	74.53
Total	577.35	2.13	

Estructura genética

Al realizar la simulación para establecer el mejor número de grupos siguiendo el método de Evanno et al (2005), el valor de K fue igual a 3. Al evaluar la estructura genética de las muestras de *V. meridionale* se apreciaron tres grupos con altos coeficientes de pertenencia de los individuos de cada cluster (por encima del 80 %). Se observó que la mayoría de las muestras se encontraron agrupadas según su lugar de procedencia. Algunas de las muestras recolectadas en el departamento de Antioquia (3) y Santander (3) mostraron más de un 50 % de probabilidad de pertenecer a la población de Boyacá. Dada la distancia geográfica entre estas localidades, esto posiblemente esté reflejando características de un ancestro común por lo que sigue existiendo información genética compartida entre las poblaciones, aunque presentan una alta estructura genética (Figura 7)

Figura 8 Estructura poblacional. a) Análisis bayesiano de conglomerados de 149 muestras de *V. meridionale* recolectadas en 15 localidades de la cordillera central y oriental de Colombia, infiriendo número de grupos $K=3$. b) Número de agrupamientos



4.3 Discusión

Recolección del material vegetal

Al comenzar la investigación se planteó la dificultad de identificar las especies *V. floribundum* y *V. meridionale* dada la complejidad de la familia Ericaceae y ante la posibilidad de la concurrencia de estas en las zonas de muestreo, además, porque el nombre común es el mismo en ciertas regiones del país. En campo se observaron diferencias morfológicas como el tamaño de las hojas, densidad foliar en ramas, y coloración de la flor. Además, se estableció comunicación con Jim Luteyn (experto en Ericaceae) para tener su apreciación sobre el material recolectado y

las características que para él son definitorias de las especies con lo que se logró incluir la forma del fruto maduro, dado que *V. meridionale* tiene su ovario en forma de cúpula que normalmente sobresale conspicuamente hasta más allá de los lóbulos del cáliz, y no plano como en *V. floribundum* y (Figura 9 c y f).

Figura 9 Disposición de hojas, flores y frutos de dos especies de plantas del género *Vaccinium*



Nota: *V. meridionale* (a) disposición de las hojas, (b) disposición y coloración de las flores (c) forma de los frutos. *V. floribundum* (d) disposición de hojas, (e) disposición y coloración de flores (f) forma de los frutos.

En el trabajo realizado por Rodríguez et al. (2019) cuyo objetivo era evaluar la diversidad genética en las especies *V. macrocarpon* y *V. oxycoccos* encontraron de 1 a 37 plantas por localidad, los autores aclararon que no incluyeron en el análisis las localidades con 1 o 2 muestras. Del mismo modo en el estudio de diversidad genética de *V. floribundum* desarrollado por Vega-Polo et al. (2020) el número de individuos varió de 3 a 7 en los 27 sitios de colecta y en el estudio de Bjedov et al (2015) para las especies *V. myrtillus*, *V. uliginosum* y *V. vitis-idaea* el rango de individuos fue de 6 a 14 individuos en cada una de las localidades por mencionar algunos. Esto demuestra que en las especies silvestres el número de individuos puede ser desigual en las

diferentes localidades ya que se desconoce el tamaño poblacional, afectaciones en el hábitat, así como limitantes de la dispersión de las plantas. Lo expuesto por estos autores se evidenció en el presente trabajo, dado que se realizó un mayor esfuerzo de muestreo para poder tener el mismo número de individuos de *V. meridionale* en algunas localidades.

Extracción de ADN

En la literatura de diversidad genética en otras especies del género *Vaccinium* no se ha reportado la dificultad de obtener ADN de buena concentración y calidad además de utilizar mayoritariamente kits de extracción en la metodología (Carvalho et al., 2014; Schlautman et al., 2018). No obstante, durante el desarrollo del presente trabajo se presentaron dificultades para lograr la extracción de ADN y al usar kits de extracción las cuantificaciones realizadas en nanodrop y la visualización en geles de agarosa la calidad y cantidad de ADN fueron bajas.

Para verificar que el protocolo se estaba realizando de manera adecuada se usaron controles correspondientes a plantas de otra especie (*Lippia organoides*). En cada protocolo de extracción realizado se tenía una muestra control en la cual era notable la extracción de ADN en el gel de agarosa (datos no mostrados). En un comienzo se pensó que las muestras se degradaban con mayor facilidad al no tener un sistema de refrigeración, al momento de tomarla en el sitio de muestreo y transportarla hasta el laboratorio, ya que estas se tomaron y depositaron en gel de sílica. Sin embargo, ensayos posteriores con muestras refrigeradas en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento en el laboratorio, arrojaron los mismos resultados. Algunas modificaciones como prolongar el tiempo de incubación con buffer de extracción y agregar proteinasa K y PolyVinyl Pyrrolidone o PVP al buffer (Kumar et al., 2011) ayudaron a obtener algunos resultados positivos pero que no fueron reproducibles. Sin embargo, a pesar de que se obtuvo ADN suficiente para

realizar los análisis con marcadores microsatélites, dada la importancia de la especie se hace primordial el ajuste del método de extracción que permita desarrollar más estudios a nivel genético con diferentes tipos de marcadores.

Análisis de diversidad

A pesar de detectarse posibles alelos nulos (alelos presentes en el ADN que no son amplificados debido a variaciones en la secuencia o mutaciones de las regiones que flanquean los cebadores de los marcadores genéticos) para algunos marcadores, esto es común en los SSR (Meng y Fang, 2014) y más si se trabajan con marcadores heterólogos (DeWoody et al., 2012; Gailite et al., 2020). Sin embargo, dado que la frecuencia promedio de alelos nulos fue bajo (0.08) y el número de marcadores adecuados para su uso en la especie era el mínimo se utilizaron todos los loci para los análisis, excepto M001 y M002 (Pico et al., 2020). Teniendo en cuenta que estos pueden ser una de las causas del déficit de heterocigotos observada para los marcadores con mayor frecuencia de alelos nulos (M002 y M007) (Oddou-Muratorio et al., 2008; DeWoody et al., 2012). Los marcadores microsatélites utilizados en este estudio tuvieron un valor de PIC en el rango de 0.10 a 0.72 con una media 0.49 lo que indica que son marcadores medianamente informativos (Botstein et al., 1980). En estudios de otras especies de *Vaccinium* los valores de PIC oscilaron de 0.30 a 0.35 (Bhatt y Debnath, 2021) de 0.37 a 0.83 (Argudo Rojas, 2017), entre 0.26 a 0.96 con (Bassil et al. 2018; Tailor et al., 2017; Vega-Polo, 2020) y de 0.44 a 0.97 (Tailor et al., 2017), lo que indica que la mayoría de los marcadores en este estudio se encuentran dentro del rango esperado de información polimórfica.

Con el marcador NA1040, en el estudio de Boches et al., (2006) en diferentes cultivares de *V. corymbosum* se reportó un número de alelos de 13, 15, 17, 20 y 31 con PIC de 0.37. En el estudio de Bassil et al., (2018) que evaluaba la diversidad en las especies *V. elliotii*, *V. fuscatum*

y *V. darrowii* para las cuales presentó un número de alelos de 16, 10 y 11 respectivamente con un PIC de 0.51 lo que demuestra que es un marcador altamente transferible a otras especies de *Vaccinium* dentro de la sección *Cyanococcus*. Sin embargo, en esta investigación el número de alelos (7), y el valor PIC (0.36) de este marcador es menor a lo reportado, y hace notable que el uso de marcadores heterólogos puede subestimar la diversidad de la especie, ya que como se indicó anteriormente, este marcador fue desarrollado y optimizado para la especie *V. corymbosum*. Un ejemplo de esto se presentó en la especie *V. floribundum* que en un análisis preliminar de la diversidad (Cobo et al., 2016) en 126 individuos e implementando marcadores heterólogos presentó una media de número de alelos de 6.1, en un trabajo posterior con 100 individuos y con marcadores específicos se obtuvo un número medio de alelos de 11.2.

Relacionado al bajo número de alelos encontrados, en la especie *V. macrocarpon* encontraron un número de alelos de 2.25 a 3.4 (Rodríguez-Bonilla et al., 2019), en híbridos y clones silvestres de *Vaccinium*, con diferentes tipos de marcadores encontraron un número de alelos de 6.30, 5.36 y 4.40 que, como en el caso del agraz, fue bajo, lo que podría deberse a la deforestación o fragmentación del hábitat de esta especie (Bhatt y Debnath, 2021), puesto que son fuentes comunes de perturbación de las poblaciones al poder producir el efecto cuello de botella (Baucom et al., 2005). Para las zonas de muestreo de *V. meridionale* también fue usual observar el uso del suelo para plantaciones forestales, agrícolas, construcción de carreteras, terreno para ganado o extracción minera para lo que erradican las plantas de estos lugares. Cabe resaltar que VCC_S10 por el número de alelos generados, mostraron una buena transferibilidad.

A pesar del número de alelos, los valores medios de heterocigosidad observada y esperada en agraz fueron de 0.48 y 0.37 respectivamente y el rango del parámetro H_o presentado en las localidades muestreadas fue de 0.37 a 0.65 lo que muestra unos niveles de moderada a alta

heterocigosidad (Rodríguez-Bonilla et al., 2019). De esta manera la diversidad observada por medio de la heterocigosidad en las localidades de agraz silvestre puede ser el resultado de diferentes mecanismos como el movimiento del polen entre poblaciones, la polinización en zonas naturales no alteradas y la dispersión por zoocoría, especialmente avifauna, que permiten mantener y enriquecer su diversidad genética (Echeverri y Toro, 2009). Esto se puede confirmar con los bajos valores del coeficiente de endogamia que fue negativo en 14 de las 15 localidades muestreadas en un rango de -0.59 a 0.06.

Esto concuerda con lo expuesto por Chamorro y Nates-Parra (2015) quienes en localidades del departamento de Boyacá registraron valores altos de depresión por endogamia representada por la alta tasa de abortos de frutos provenientes de autogamia. Lo cual según varios autores (Guillaume y Jacquemart, 1999; Hokanson y Hancock, 2000; Nuortila et al., 2002) es común que se dé en plantas de este género dado a que son perennes y clonales. Además de las características estructurales y estrategias de la planta que podrían indicar que prevalece la fertilización cruzada o alogamia en condiciones naturales tales como la posición de las flores (pendulares), anteras poricidas (polinización), sesgo femenino en la producción de néctar, gran despliegue floral, longevidad floral y poblaciones ginodioicas.

Diferenciación y estructura

Según Perez et al., (2018), una prueba de aislamiento por distancia es primordial antes de realizar el análisis de estructura genética. Los resultados de la prueba de Mantel en la especie *V. floribundum* según los autores confirmaron una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas con un valor de $r = 0,29$ y $p = 0,0001$, sugiriendo que un modelo de aislamiento por distancia geográfica también explica parte de la estructura poblacional de esta especie en Ecuador. En el presente estudio la prueba de Mantel arrojó un $r^2 = 0.693$ y $p = 0.0000$ lo

que significaría que también la distancia geográfica explica en parte la estructura poblacional. Sin embargo, una mayor continuidad de las zonas de muestreo como en el caso de *V. floribundum* pueda ser de mayor soporte para llegar a establecer una mayor correspondencia.

En el análisis de estructura los individuos se presentaron agrupados en tres clusters genéticos. El cluster 1 conformado por todos los individuos procedentes de la Cordillera Central, presentó alta diferenciación con los clusters 2 (F_{ST} 0.19) y 3 ($F_{ST}=0.28$) que agruparon los individuos de la Cordillera Oriental. El grado de diferenciación entre los cluster 2 y 3 también fue alto ($F_{ST}=0.18$). De acuerdo con estos resultados, *V. meridionale* presenta una alta estructura genética según los intervalos propuestos por Wright. Esto refleja que el flujo genético es bajo, dada la dificultad de las poblaciones al tener una conectividad limitada por la fragmentación del paisaje (Young et al., 1996) como puede ser en el caso de las localidades separas por extensiones de cultivo de pino y a escala de los tres grupos o departamentos a la amplia distancia del Valle del Magdalena que hay entre las dos cordilleras, puesto que la dispersión de las semillas por aves y mamíferos se da en distancias próximas a 300 m.

De esta manera, las diferencias encontradas a nivel genético podrían deberse a las características de los sitios en los que se encuentran las plantas de agraz. El sitio de la Cordillera Central en el que se encuentra el municipio de Santa Rosa de Osos es la zona más ancha de la cordillera con un sistema de altiplanos de la que hace parte el altiplano de Santa Rosa de Osos conformado por una superficie de erosión (CORANTIOQUIA et al., 2002) en el que se presenta un Orobioma medio de los Andes, con temperaturas entre los 12 y 18 °C. Los sitios donde se encontraron los individuos de *V. meridionale* fueron áreas con vegetación herbácea y arbustiva de tipo natural cerca a zonas de uso agrícola o de plantaciones forestales.

En cuanto a la Cordillera Oriental las localidades del municipio de Ráquira, se encuentran en el altiplano cundiboyacense en el cual se presenta un Orobioma azonal andino. En esta región las plantas de agraz eran observadas en bordes de la carretera destapada que comunicaba las diferentes veredas del municipio con vegetación arbustiva o en parches de robledales. El tipo de bioma de la zona donde se encuentra Ráquira dado a sus características biofísicas es considerado como una isla biogeográfica que alberga plantas y animales únicos (Calvachi Zambrano, 2012). Más al norte de la cordillera oriental están las localidades de Santander, los cuales hacen parte del macizo de Santander con Orobioma de bosque subandino.

Finalmente, por medio de los marcadores microsatélites utilizados se da un primer acercamiento a la diversidad genética de la especie *V. meridionale* en Colombia, así como también para Suramérica puesto que no se han desarrollado investigaciones, en los otros países que cuentan con el sistema montañoso de la Cordillera de los Andes que brinda las condiciones adecuadas para el desarrollo de la especie. Además, esta información es de utilidad para la selección y preservación de individuos que sean representativos de la diversidad y puedan ser empleados a futuro en programas de mejoramiento o en planes de restauración. Si bien *V. meridionale* no se encuentra en alguna categoría de amenaza debido a que no ha sido estudiada, las observaciones realizadas en campo por otros autores y en este estudio demuestran el riesgo de la disminución de las poblaciones por la transformación del paisaje y el uso de la tierra para diferentes fines económicos, lo que pone en evidencia la necesidad de realizar investigaciones del riesgo de *V. meridionale*.

5. Marcadores para la determinación taxonómica de *V. meridionale* mediante la evaluación de las regiones *rbcL*, *matk*, *trnH-psbA* y *ycf*.

5.1 Metodología

Selección del material vegetal

Se tomaron 9 muestras botánicas fértiles de *V. meridionale* en Antioquia (3), Boyacá (3) y Santander (3) y 3 de *V. floribundum* de Santander para incluir en el herbario de la UIS, además, muestras de hojas para el análisis de barcoding. La asignación de la especie se realizó teniendo en cuenta las características morfológicas descritas en el capítulo anterior y con la revisión del experto en Ericaceas, James Luteyn.

Amplificación y secuenciación

Se evaluó la amplificación por PCR de marcadores para las regiones plásticas *rbcL*, *matk*, *ycf*, la región no codificante *trnH-psbA*, y de la región nuclear ITS; las condiciones de amplificación fueron las reportadas por los autores (Tabla 11, Apéndice C). Las pruebas de amplificación se realizaron con un volumen de reacción de 10 ul que contenía una concentración 0.4 uM de cebador R, 0.4 uM de cebador F, 5 uL Green taq Master mix y 2.5 ul de ADN (concentración variable). La visualización del producto amplificado se hizo en geles de agarosa al 1.5 %, a 80 voltios por 1 h. Al comprobarse la correcta amplificación mediante la observación de una banda definida, se procedió a la amplificación de reacciones de 25 uL, para posteriormente purificarlos con el kit *EZ-10 spin column PCR products purification* y enviarlo a secuenciar con el proveedor ISLA S.A.

Tabla 11 Lista de cebadores usados para obtención de posibles secuencias para barcoding de *Vaccinium meridionale*

Región	Cebadores	Secuencia	Referencia
trnH-psbA	F trnH	CGCGCATGGTGGTGGATTACACAATCC	(Costion et al., 2011)
	R psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	
matK	F matK3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	(Khan et al., 2019)
	R matK1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
matk1	F matK-xF	TAATTTACGATCAATTCATTC	(Lima et al., 2018)
	R matK-MALPR1	ACAAGAAAGTCGAAGTAT	
matk 2	F matK_390f	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	(Stewart y Globig, 2012)
	R matK_1326r	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
matk 3	F matK 2.1a	ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	(Li et al., 2012)
	R matK 5	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	
rbcL	F rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	(Costion et al., 2011)
	R rbcL724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
rbcL 1	F rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	(Vijayan y Tsou, 2010)
	R rbcLa-R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	
RbcL2	F 1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	(Dong et al., 2015)
	R 724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
ycf	F ycf1bF	TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT	(Chen et al., 2010)
	R ycf1bR	ATACATGTCAAAGTGATGGAAAA	
ITS	F ITS 5a fwd	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	
	R ITS 4 rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Análisis de secuencias

Las secuencias se editaron con el software CodonCode Aligner v. 9.0.1 (CodonCode Corporation), con el cual se eliminaron los extremos de cada secuencia que presentaron una baja calidad basado en el valor de Phred. Se consultaron secuencias de las mismas especies en la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en USA (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) y se alinearon para observar posibles diferencias.

Una vez terminada la fase de análisis de las secuencias se procedió a subir la información de georreferenciación, datos del muestreo, fotografías de los especímenes, números de catálogo, secuencias editadas y secuencias consenso en el BoldSystems en el proyecto público titulado Barcoding-CC-UIS.

5.2 Resultados

Se ingresaron 12 muestras a la colección del Herbario de la Universidad Industrial de Santander (Figura 9), los cuales fueron registrados en el SIB Colombia (17D2E04E8B5). La fotografía de los vouchers fue utilizada como información completaría de las secuencias que fueron útiles para ingresar el Bold Systems en el proyecto público titulado Barcoding-CC-UIS.

Figura 10 Ejemplar de *V. meridionale* recolectado en el departamento de Santander ingresado a la colección del Herbario de la Universidad Industrial de Santander



Amplificación y secuenciación

Al probar la amplificación de los cebadores propuestos para las secuencias de barcode, no se observó producto de PCR para ninguna de las muestras evaluadas al utilizar los correspondientes a la región YCF. Las regiones *rbcL* (*rbcL1*) y *TrnH-psbA* mostraron producto amplificado, en todas las muestras. Cabe resaltar que las condiciones de amplificación que funcionaron para la región *TrnH-psbA* fueron las reportadas por Jeanson et al (2011). De los cuatro

pares de cebadores para la región matK, el desarrollado por Stewart y Globig (2012) amplificó en ocho de las nueve muestras de *V. meridionale*. El marcador ITS presentó buen producto de amplificación para cinco de las nueve muestras en el gel de agarosa al 1.5% (Figura 10). A pesar de intentarse la obtención de amplicones para todas las muestras esto no fue posible (Tabla 12).

De las muestras enviadas a secuenciar, en el proceso de revisión, se descartaron varias por la baja calidad que presentaron (Phred < 30). De esta manera, la edición y alineamiento se realizó para 7 secuencias de rbcL, 6 de matK, 8 de trnh-psbA y 7 de ITS.

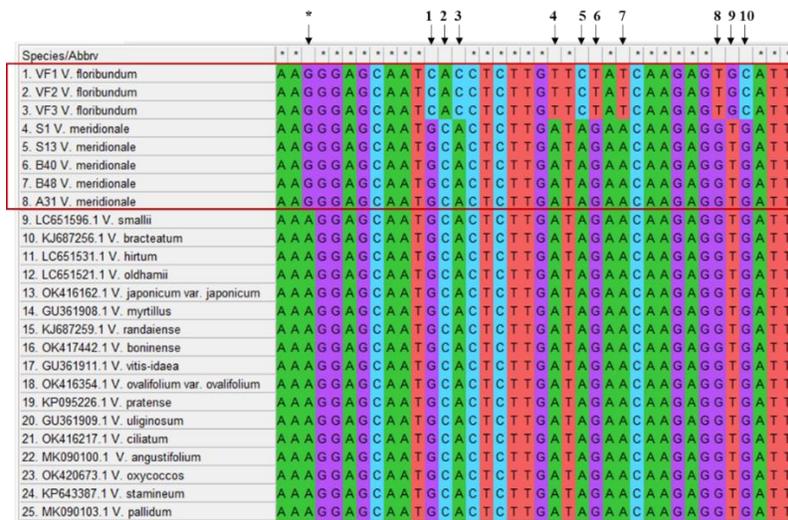
Tabla 12 Muestras con producto de PCR para las regiones TrnH-psbA, rbcL, matK, ITS y ycf

Muestras/ Cebadores	S1	S13	S38	B21	B40	B48	A7	A11	A30	VF1	VF2	VF3	Total
rbcL													12
TrnH													12
matK													10
ITS													7
ycf													0

Nota: el recuadro verde indica la obtención de producto de PCR, el cuadro gris indica la muestra sin producto de PCR. La letra que acompaña el número de la muestra indica el departamento de recolección S (Santander), B (Boyacá), A (Antioquia). VF (*V. floribundum* recolectada en Santander)

comparación con secuencias de 17 especies del género *Vaccinium*. En el alineamiento obtenido, se mantuvieron los 10 sitios variables característicos de *V. floribundum*. Además, se encontró que en la posición 289 *V. meridionale* y *V. floribundum* presentaban una Guanina y el resto de las especies una Adenina (Figura 12).

Figura 13 Alineamiento de las secuencias de la región *TrnH-psbA* de muestras de *V. meridionale* y *V. floribundum* muestreadas en Colombia y otras especies de *Vaccinium*

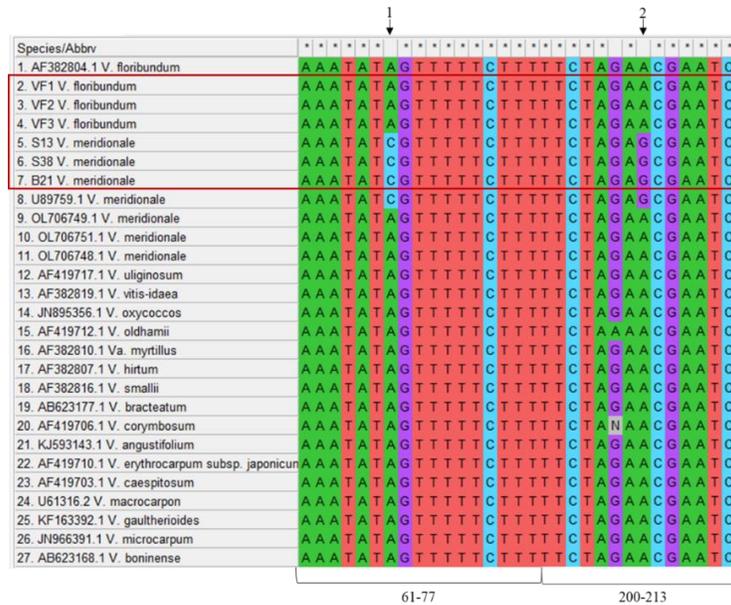


Nota: En la figura se muestran los 10 sitios variables entre las especies de *Vaccinium* y *V. floribundum*. Los números indican las posiciones en el alineamiento: 1 (298), 2 (299), 3(300), 4 (307), 5 (309), 6 (310), 7(312), 8 (319), 9 (320), 10 (321) y el asterisco indica la posición 289.

En el alineamiento de las secuencias de la región *matK* de las muestras de *V. floribundum* y *V. meridionale* obtenidas en el presente estudio, se observaron dos sitios variables, uno en la posición 67 (A:C) y otro en la 207 (A:G) (Figura 13). Sin embargo, al incluir en el alineamiento secuencias de estas dos especies localizadas en Perú, no se presentaron las variaciones. Al realizar el alineamiento con secuencias obtenidas del GenBank de otras 16 especies del género *Vaccinium*,

la presencia de una C en la posición 67 y una G en la posición 207, sólo se observó en las muestras de Colombia (Figura 13).

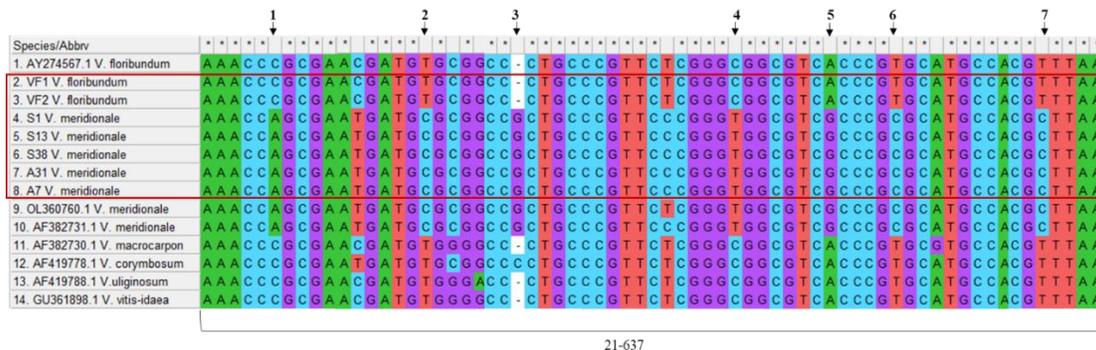
Figura 14 Alineamiento de las secuencias de la región *matK* de muestras de *V. meridionale* y *V. floribundum* de Colombia y Perú



Nota: Se observan los fragmentos del alineamiento donde se encuentran las posiciones variables entre las especies de *Vaccinium* spp. y *V. meridionale*. El número 1 indica la posición 67 y el número 2 la posición 207.

De la región ITS se amplificaron y secuenciaron dos muestras de *V. floribundum* y cinco muestras de *V. meridionale*. En el alineamiento con las otras especies de *Vaccinium* se observaron siete sitios variables donde *V. meridionale* se diferenció en la posición 26 (C:A), 58 (T:C), 212 (-:G), 228 (C:T), 431 (A:G), 583 (T:C) y 633 (T:C) (Figura 14).

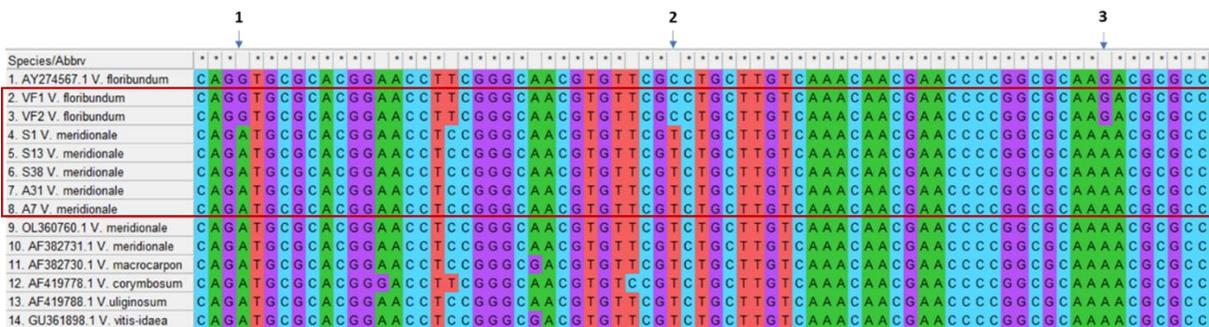
Figura 15 Alineamiento de las secuencias de la región ITS de muestras de *V. meridionale* y *V. floribundum* muestreadas en Colombia y otras especies de *Vaccinium*



Nota: En la figura los números indican las posiciones variables en el alineamiento: 1 (26), 2 (58), 3 (212), 4 (228), 5(431), 6(583), 7(633).

Además, se observaron cuatro sitios en los que se diferenciaban cinco especies de *Vaccinium* con *V. floribundum*, en la posición 111 (A:G), 142 (T:C), 173 (A:G) y 561 (C:T) (Figura 15).

Figura 16 Alineamiento de las secuencias de la región ITS de muestras de *V. meridionale* y *V. floribundum* muestreadas en Colombia y otras especies de *Vaccinium* con sitios diferenciales para la especie *V. floribundum*



5.3 Discusión

Se realizaron varios ensayos de amplificación de las diferentes regiones para cada muestra, sin embargo, en algunas no se obtuvo producto de PCR o en caso de observarse banda en el gel de agarosa algunas secuencias presentaron una baja calidad. Esto debido posiblemente a la presencia de contaminantes en las muestras de ADN que pueden inhibir la reacción o causar productos de PCR errados (Sánchez et al., 2012). En plantas de este género es posible tener una excesiva contaminación con metabolitos secundarios como polisacáridos y fenoles (Allen et al., 2006) los cuales pueden inhibir las reacciones en los diferentes procesos en los que se utilice el ADN, como por ejemplo en la PCR. Según Schrader et al. (2012) los compuestos fenólicos degradan la ADN polimerasa y los fenoles pueden alterar el proceso enzimático al imitar la estructura del ADN.

Una de las características de las secuencias para código de barras es que tengan una fácil amplificación y secuenciación por lo cual el marcador para la región trnH-psbA presentó un 100 % de amplificación, seguido de matk con 83 %, de ITS y rbcL con un 58.3 % y finalmente el marcador evaluado para la región ycf que no cumple con este requisito con un 0 % de producto de PCR de las muestras de este estudio.

En cuanto a la especificidad en la variación, las regiones rbcL, matK e ITS cuentan con poca representación en las bases de datos de referencia para las especies *V. meridionale* y *V. floribundum* por lo que es importante continuar alimentando las bases de datos con individuos de diferentes localidades geográficas, lo que permitiría determinar el grado de diversidad intraespecífica que pueda tener cada región. Sin embargo, con las secuencias obtenidas en este trabajo, la región rbcL no sería óptima para código de barras en estas especies de *Vaccinium*. La región matk mostró diferencias entre las muestras de *V. meridionale* de Colombia y de Perú lo cual podría deberse a la variación intraespecífica. La región ITS mantuvo las posiciones variables en

las muestras de *V. meridionale* y *V. floribundum* reportadas en este estudio y las publicadas en el GenBank. Si bien la región trnH no contaba con secuencias de referencia para las especies, la clara diferenciación de *V. floribundum* respecto a las otras especies de *Vaccinium* encontrada en este trabajo demuestra la posibilidad de utilizar esta región como código de barras para la especie.

Otra característica de los códigos de barras es que deben ser fragmentos cortos (<800 bases) para que puedan ser amplificados con mayor facilidad por PCR en caso de usarse ADN degradado, para facilitar la manipulación experimental y que tenga un bajo costo (Dong et al., 2015). Teniendo en cuenta los fragmentos en donde se identificaron las diferencias entre las especies, estos marcadores también cumplirían con este requisito.

6. Conclusiones

- Los caracteres morfológicos evaluados permitieron determinar un alto porcentaje de variación entre las plantas de las localidades de Santander siendo las medidas relacionadas a la hoja las más representativas. Sin embargo, al ser plantas silvestres estos parámetros son afectados por múltiples factores como edad de la planta, disponibilidad de luz, nutrientes, entre otros.
- Los marcadores microsatélites seleccionados permitieron caracterizar a nivel genético la especie con lo que se logró evaluar la diversidad genética y estructura poblacional. Siendo este el primer estudio a nivel genético realizado en *Vaccinium meridionale*. No obstante, es necesaria la inversión en la obtención de marcadores específicos para la especie y la estandarización de un protocolo de extracción óptimo que permita ampliar los estudios genéticos.
- En este estudio, *V. meridionale* presentó niveles de alta diversidad en las localidades de Boyacá, del municipio de Ráquira, L6 de la vereda Firita Peña Abajo, L8 y L9, vereda Torres y en la localidad L1 del departamento de Antioquia, municipio Santa Rosa de Osos, vereda El Vergel, debido posiblemente al tamaño de las poblaciones que facilita un mayor entrecruzamiento.
- La menor diversidad se presentó en la localidad 15 ubicada en la vereda La Chorrera, municipio de Vetas, Santander lo que coincide con uno de los valores más altos de endogamia encontrado. Así como también de la ausencia de flores en las plantas muestreadas.

- Se presentó una alta diferenciación genética entre las poblaciones de la Cordillera Central y la Cordillera Oriental, que muestra una correlación significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética debido posiblemente a la presencia de la barrera geográfica del Valle del Magdalena. Por lo anterior se presentan tres poblaciones claramente diferenciadas y asociadas al lugar de procedencia de las plantas.
- El análisis de estructura poblacional evidencia que los individuos de *V. meridionale* pertenecen a tres acervos genéticos definidos con bajos niveles de introgresión.
- Los marcadores ITS y trnH-psbA son discriminantes entre las especies de *V. meridionale* y *V. floribundum*, lo que sugiere que pueden ser utilizados para complementar los procesos de identificación y clasificación taxonómica de estas especies.

Referencias Bibliográficas

- Alexander, P. J., Rajanikanth, G., Bacon, C. D., & Bailey, C. D. (2006). Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns: TECHNICAL ARTICLE. *Molecular Ecology Notes*, 7(1), 5-9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01549.x>
- Allen, G. C., Flores-Vergara, M. A., Krasynanski, S., Kumar, S., & Thompson, W. F. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, 1(5), 2320-2325. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.384>
- Arango-Varela, S. S., Luzardo-Ocampo, I., & Maldonado-Celis, M. E. (2022). Andean berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice, in combination with Aspirin, displayed antiproliferative and pro-apoptotic mechanisms in vitro while exhibiting protective effects against AOM-induced colorectal cancer in vivo. *Food Research International*.
- Argudo Rojas, A. D. (2017). *Desarrollo y estandarización de marcadores microsatélites específicos para mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Universidad San Francisco de Quito USFQ.
- Arias Pineda, A. (2017). *Potencialidades y retos en la producción del agraz en Antioquia* [Universidad EAFIT].
https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/12582/Andr%c3%a9s_AriasPineda_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Azmat, M. A., Khan, I. A., Cheema, H. M. N., Rajwana, I. A., Khan, A. S., & Khan, A. A. (2012). Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(4), 239-243.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1100194>

- Bassil, N., Bidani, A., Hummer, K., Rowland, L. J., Olmstead, J., Lyrene, P., & Richards, C. (2018). Assessing genetic diversity of wild southeastern North American *Vaccinium* species using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(3), 939-950. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0585-2>
- Baucom, R. S., Estill, J. C., & Cruzan, M. B. (2005). The effect of deforestation on the genetic diversity and structure in *Acer saccharum* (Marsh): Evidence for the loss and restructuring of genetic variation in a natural system. *Conservation Genetics*, 6(1), 39-50. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7718-9>
- Bhatt, D., y Debnath, S. (2021). Genetic Diversity of Blueberry Genotypes Estimated by Antioxidant Properties and Molecular Markers. *Antioxidants*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/antiox10030458>
- Bjedov, I., Obratov–Petković, D., Mišić, D., Šiler, B., & Aleksic, J. (2015). Genetic patterns in range-edge populations of *Vaccinium* species from the central Balkans: Implications on conservation prospects and sustainable usage. *Silva Fennica*, 49(4). <https://doi.org/10.14214/sf.1283>
- Boches, P. S., Bassil, N. V., & Rowland, L. J. (2005). Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 657-660. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01025.x>
- Buitrago Guacaneme, C. M., Rincón Soledad, M. C., Balaguera López, H. E., & Ligarreto Moreno, G. A. (2015). Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7521-7531. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47840>
- Calvachi Zambrano, B. (2012). Los ecosistemas semisecos del altiplano cundiboyacense, bioma azonal singular de Colombia, en gran riesgo de desaparición. *Revista Mutis*, 2(2), 26-59. <https://doi.org/10.21789/22561498.364>

- Carvalho, M., Matos, M., & Carnide, V. (2014). Fingerprinting of *Vaccinium corymbosum* cultivars using DNA of fruits. *Horticultural science*, 41(4), 175-184. <https://doi.org/10.17221/21/2014-HORTSCI>
- Chamorro, F. J., y Nates-Parra, G. (2015). Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) en los Andes orientales de Colombia. *Rev. Biol. Trop.*, 63, 16.
- Chaparro, M., y Becerra, N. (1995). Anatomía del fruto del Agraz. *Acta Biológica Colombiana*, 9.
- Cobo, M. M. (2014). *Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) en tres Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi.* <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3332>
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., Torres, A. F., y Torres, M. de L. (2016). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical Systematics and Ecology*, 64, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.11.008>
- CORANTIOQUIA (2015). Convenio interadministrativo de asociación entre el departamento de Antioquia – Departamento Administrativo de Planeación y la Corporacion Autonoma Regional del Centro de Antioquia – de CORANTIOQUIA. https://www.corantioquia.gov.co/ciadoc/SUELO/AIRNR_CV_1502_6_2015_MEMORIAS_SANTAROSA_DE_OSOS.pdf
- Costion, C., Ford, A., Cross, H., Crayn, D., Harrington, M., & Lowe, A. (2011). Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. *PLoS ONE*, 6(11), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026841>
- Debnath, S., y An, D. (2019). Antioxidant properties and structured biodiversity in a diverse set of wild cranberry clones. *Heliyon*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01493>

- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., Cheng, T., Guo, J., & Zhou, S. (2015). Ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep08348>
- Doyle, J. (1991). DNA Protocols for Plants. En G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, y J. P. W. Young (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy* (pp. 283-293). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Echeverri A, Toro JL (2009) Conozcamos y usemos el mortiño. CORANTIOQUIA, Medellín, Colombia
- Ehlenfeldt, M. K., & Luteyn, J. L. (2021). Fertile Intersectional F1 Hybrids of 4x *Vaccinium meridionale* (Section *Pyxothamnus*) and Highbush Blueberry, *V. corymbosum* (Section *Cyanococcus*). *HortScience*, 56(3), 318-323. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15523-20>
- Ehlenfeldt, M. K., Polashock, J. J., Vorsa, N., Zalapa, J., de la Torre, F., & Luteyn, J. L. (2023). Fertile Intersectional F1 Hybrids of 4x Andean Blueberry (*Vaccinium meridionale*) and 4x American Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *HortScience*, 58(2), 234-239. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16824-22>
- Excoffier L, y Lischer HEL. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Gailīte, A., Gaile, A., & Ruņģis, D. (2020). Genetic diversity and structure of wild *Vaccinium* populations—*V. myrtillus*, *V. vitis-idaea* and *V. uliginosum* in the Baltic States. *Silva Fennica*, 54(5). <https://doi.org/10.14214/sf.10396>
- Garzon, G., Narvaez, C., Riedl, K., y Schwartz, S. (2010). Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz)

from Colombia. *Food chemistry*, 122(4), 980-986.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.017>

Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., y Medina, C. (2009). *Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño*. 21.

Glaubitz, J. C. (2004). convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 309-310.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00597.x>

Gobernación de Santander, 2020.
<https://historico2.santander.gov.co/index.php/actualidad/item/4631-gobernacion-de-santander-mitiga-la-sequia-en-cuatro-municipios-del-departamento>

González, M. A. y Quintero, L. 2017. Plantas. En: González M. A., Arenas-Castro H. (Eds). 2017. *Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos* (pp. 11). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
<http://www.humboldt.org.co/es/component/k2/item/1134-recoleccion-tejidos-biologicos>

Guillaume, P., & Jacquemart, A.-L. (1999). Early-inbreeding depression in *Vaccinium myrtillus* and *V. vitis-idaea*. *Protoplasma*, 208(1-4), 107-114. <https://doi.org/10.1007/BF01279080>

Hjalmarsson, I., y Ortiz, R. (1998). Effect of genotype and environment on vegetative and reproductive characteristics of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 48(4), 255-262. <https://doi.org/10.1080/09064719809362506>

Hokanson, K., y Hancock, J. (2000). Early-acting inbreeding depression in three species of *Vaccinium* (Ericaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 13(3), 145-150. <https://doi.org/10.1007/s004970000046>

Ivanova N.V., Fazekas A.J., Hebert P.D.N. 2008. Semi-automated, Membrane-Based Protocol for DNA Isolation from Plants. *Plant Mol Biol Rep* 26:186–198

- Jeanson, M. L., Labat, J.-N., & Little, D. P. (2011). DNA barcoding: A new tool for palm taxonomists? *Annals of Botany*, 108(8), 1445-1451. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr158>
- Jurikova, T., Skrovankova, S., Mlcek, J., Balla, S., & Snopek, L. (2018). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Biological Effects of European Cranberry (*Vaccinium oxycoccos*). *Molecules*, 24(1), 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24010024>
- Kawamura, K., y Takeda, H. (2002). Light environment and crown architecture of two temperate *Vaccinium* species: Inherent growth rules versus degree of plasticity in light response. *Canadian Journal of Botany*, 80(10), 1063-1077. <https://doi.org/10.1139/b02-096>
- Khan, S. A., Baeshen, M. N., Ramadan, H. A., y Baeshen, N. A. (2019). ITS2: An Ideal DNA Barcode for the Arid Medicinal Plant *Rhazya Stricta*. *Pharmaceutical Medicine*, 33(1), 53-61. <https://doi.org/10.1007/s40290-019-00266-3>
- Kumar, A., Singh, C., LaVoie, H., DiPette, D., y Singh, U. (2011). Resveratrol Restores Nrf2 Level and Prevents Ethanol-Induced Toxic Effects in the Cerebellum of a Rodent Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Molecular pharmacology*, 80(3), 446-457. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071126>
- Kron, K. A., Powell, E. A., & Luteyn, J. L. (2002). Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (*Vaccinieae*, *Ericaceae*) based on sequence data from *MATK* and nuclear ribosomal *ITS* regions, with comments on the placement of *Satyria*. *American Journal of Botany*, 89(2), 327-336. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.2.327>
- Li, M., Au, K.-Y., Lam, H., Cheng, L., Jiang, R.-W., But, P. P.-H., & Shaw, P.-C. (2012). Identification of Baiying (*Herba Solani Lyrati*) commodity and its toxic substitute Xungufeng (*Herba Aristolochiae Mollissimae*) using DNA barcoding and chemical profiling techniques. *Food Chemistry*, 135(3), 1653-1658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.049>

- Ligarreto,. (2009). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia.*
- Ligarreto, G. A., Patino, M. del P., & Magnitskiy, S. V. (2011). Phenotypic plasticity of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in wild populations of mountain forests in Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 569-583.
- Ligarreto-Moreno, G. A., Torres-Aponte, W. S., & Ariza-Castillo, C. A. (2013). *Propagation of the neotropical fruit Vaccinium meridionale Swartz by air layering.*
- Lima, R. A. F. de, Oliveira, A. A. de, Colletta, G. D., Flores, T. B., Coelho, R. L. G., Dias, P., Frey, G. P., Iribar, A., Rodrigues, R. R., Souza, V. C., y Chave, J. (2018). Can plant DNA barcoding be implemented in species-rich tropical regions? A perspective from São Paulo State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 41, 661-670. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0282>
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*, 68(1), 55-87. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068\[0055:DAAEIN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0055:DAAEIN]2.0.CO;2)
- Luteyn, J. L., & Pedraza-Peñalosa, P. (2021). *Guide to the genera of lianas and climbing plants in the neotropics.* 25.
- Magnitskiy, S. V., & Ligarreto, G. A. (2007). El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(2), 137-141. <https://doi.org/10.17584/rcch.2007v1i2.1155>
- Marshall, TC, Slate, J, Kruuk, LEB & Pemberton, JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>

- Matuszak, S. (2015). *Evolution of mountain plants in the region of the Qinghai-Tibetan Plateau and beyond*. <https://d-nb.info/1092187448/34>
- Medina, C. I., Lobo, M., Patiño, M. del P., Ligarreto, G. A., Delgado, O. A., Lopera, S. A., & Toro, J. (2009). *Variabilidad morfológica en agraz o mortiño (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia*.
- Medina Cano, C. I. (2010). *Variabilidad poblacional y ecofisiológica del mortiño (Vaccinium meridionale Sw.) especie con potencial productivo y agroexportador en el trópico altoandino*. Universidad Nacional de Colombia.
- Medina Cano, Clara Inés, Lobo Arias, Mario, Castaño Colorado, Álvaro Arley, y Cardona, Luis Eduardo. (2015). Análisis del desarrollo de plantas de mortiño (*Vaccinium meridionale Swart.*) bajo dos sistemas de propagación: clonal y sexual. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 16(1), 65-77. Retrieved May 11, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062015000100006&lng=en&tlng=es.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>
- Milgroom, M. G. (2017). CHAPTER 3: Sampling and the Estimation of Genetic Diversity. En G. M. Michael (Ed.), *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and Evolution* (pp. 37-57). The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544525.003>
- Mojica, D. J. M. (2019). *Estandarización de marcadores moleculares microsatélites en muestras de Vaccinium floribundum del páramo de Santurbán*. 61.

- Morales, M. A. (2018). *Más del 80% de la población de Vetás, Santander, se encuentra sin empleo*.
<https://www.vanguardia.com/economia/local/mas-del-80-de-la-poblacion-de-vetas-santander-se-encuentra-sin-empleo-KEVL437409>
- Muñoz, Juan David, Martínez, Luis Joel, y Ligarreto, Gustavo Adolfo. Caracterización de los ambientes agroecológicos del agraz o mortiño (*Vaccinium Meriodionale Swartz*), En la zona altoandina de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional De Colombia, 2009. Print.
- Nuortila, C., Tuomi, J., y Laine, K. (2002). Inter-parent distance affects reproductive success in two clonal dwarf shrubs, *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium vitis-idaea* (Ericaceae). *Canadian journal of botany-revue canadienne de botanique*, 80(8), 875-884. <https://doi.org/10.1139/B02-079>
- Paz, A., Gonzalez, M., y Crawford, A. (2011). *Códigos de barras de la vida: Introducción y perspectiva*. 15.
- Peakall, R., y Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts46>
- Perez, M. F., Franco, F. F., Bombonato, J. R., Bonatelli, I. A. S., Khan, G., Romeiro-Brito, M., Fegies, A. C., Ribeiro, P. M., Silva, G. A. R., y Moraes, E. M. (2018). Assessing population structure in the face of isolation by distance: Are we neglecting the problem? *Diversity and Distributions*, 24(12), 1883-1889. <https://doi.org/10.1111/ddi.12816>
- Prieto, C. (2018). Agricultura al día: Así es un cultivo de agraz. [video]. Recuperado de: https://www.youtube.com/watch?v=xo--teLFE_Q

- Pritchard JK, Stephens M y Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461096/pdf/10835412.pdf>
- Quevedo Rubiano, S. (2020). *Caracterización bajo el enfoque SIAL y análisis de la competitividad sistémica: El caso del agraz de las provincias de Occidente y Ricaurte (Boyacá – Colombia)* [Trabajo de grado - Maestría, Universidad Nacional de Colombia].
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77544>
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Rache Cardenal, L. Y., y Pacheco Maldonado, J. C. (2010). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 24(4), 1086-1095.
<https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000400024>
- Rodríguez Beraud, M. M., y Morales Ulloa, D. M. (2015). Shading nets effect on the production and quality of blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Brigitta. *Scientia Agropecuaria*, 41-50.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.04>
- Rodriguez-Bonilla, L., Rodriguez Bonilla, F., Matusinec, D., Wiesman, E., Schoville, S. D., Atucha, A., y Zalapa, J. (2019). Exploring the Genetic Diversity of Wild Cranberry Populations in the Upper Midwestern United States. *Crop science*, 59(6), 2413-2428.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2019.06.0367>
- Sánchez-Coello, N. G., Luna-Rodríguez, M., Vázquez-Torres, M., Sánchez-Velásquez, L. R., Santana-Buzzy, N., Octavio-Aguilar, P., y Iglesias-Andreu, L. G. (2012). Optimización de un protocolo del aislamiento del ADN y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana*

- Brongn. (Zamiaceae). *Revistas Chapingo Seria Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XVIII(1), 123-133. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.03.024>
- Salinas, N. R., y Betancur, J. (2007). *Novedades taxonómicas de las ericáceas del suroccidente de Colombia*. 8.
- Schlautman, B., Covarrubias-Pazarán, G., Rodríguez-Bonilla, L., Hummer, K., Bassil, N., Smith, T., y Zalapa, J. (2018). Genetic diversity and cultivar variants in the NCGR cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) collection. *Journal Of Genetics*, 97(5), 1339-1351.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Song, G.-Q., y Hancock, J. F. (2011). *Vaccinium*. En C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 197-221). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8_10
- Stewart, P., y Globig, S. (Eds.). (2012). *Vascular Plants and Paleobotany*. Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/b12226>
- Suárez-Ballesteros, C. I., Calderón-Hernández, M., & Mancipe-Murillo, C. (2018). Propagación sexual y tolerancia a la desecación del agraz (*Vaccinium meridionale* Sw) de tres fuentes semilleras localizadas en Ráquira, San Miguel de Sema (Boyacá) y Gachetá (Cundinamarca). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 42(163), 207. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.614>
- Taylor, S., Bykova, N. V., Igamberdiev, A. U., y Debnath, S. C. (2017). Structural pattern and genetic diversity in blueberry (*Vaccinium*) clones and cultivars using EST-PCR and microsatellite

markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(8), 2071-2082.
<https://doi.org/10.1007/s10722-017-0497-1>

Tineo, D., Bustamante, D. E., Calderon, M. S., & Huaman, E. (2022). Exploring the diversity of andean berries from northern Peru based on molecular analyses. *Heliyon*, 8(2), e08839.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08839>

Torres-Díaz, C., Gómez-González, S., Stotz, G. C., Torres-Morales, P., Paredes, B., Pérez-Millaqueo, M., y Gianoli, E. (2011). Extremely Long-Lived Stigmas Allow Extended Cross-Pollination Opportunities in a High Andean Plant. *PLoS ONE*, 6(5), e19497.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019497>

Valencia, M., y Ramirez, F. (1993). Notes regarding morphology, anatomy and germination of Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomia Colombiana*, 2, 151-159.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICROCHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>

Vega-Polo, P., Cobo, M. M., Argudo, A., Gutierrez, B., Rowntree, J., y Torres, M. de L. (2020). Characterizing the genetic diversity of the Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.) across the Ecuadorian Highlands. *PLOS ONE*, 15(12), e0243420.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243420>

Vijayan, K., y Tsou, C. H. (2010). DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective. *Current Science*, 99(11), 1530.

Young A., Boyle T., Brown T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413–418. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10045-8](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(96)10045-8).

Apéndices

Apéndice A Información de puntos de recolección de muestras de *V. meridionale* en localidades de la cordillera oriental y central de Colombia.

Departamento	Municipio	Vereda	Localidad	Código de recolección	Latitud	Longitud	Altitud
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A1	6 40 43.5	-75 23 56.5	2615
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A2	6 40 46.7	-75 23 58.3	2631
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A3	6 40 48.6	-75 24 00.1	2629
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A4	6 40 52.7	-75 24 00.3	2628
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A5	6 40 58.2	-75 24 01.4	2633
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A6	6 40 58.0	-75 24 03.4	2635
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A7	6 40 59.7	-75 24 04.4	2635
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A8	6 41 03.3	-75 24 06.4	2647
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A9	6 41 02.6	-75 24 08.2	2655
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L1	A10	6 41 00.2	-75 24 09.6	2664
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A11	6 42 07.1	-75 23 32.8	2631
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A12	6 42 03.5	-75 23 35.0	2628
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A13	6 42 00.0	-75 23 40.1	2632
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A14	6 41 58.0	-75 23 43.4	2623
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A15	6 41 56.3	-75 23 48.5	2624
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A16	6 41 51.9	-75 23 49.9	2623
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A17	6 41 44.5	-75 23 54.2	2635
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A18	6 41 46.5	-75 23 57.1	2653
Antioquia	Santa Rosa de Osos	El Vergel	L2	A19	6 41 40.9	-75 23 58.0	2643
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A20	6 50 13.1	-75 32 48.5	2800
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A21	6 50 10.6	-75 32 49.3	2788
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A22	6 50 09.3	-75 32 49.5	2783
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A23	6 50 07.4	-75 32 50.8	2769
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A24	6 50 09.9	-75 32 52.4	2768
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A25	6 50 09.6	-75 32 55.2	2779
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A26	6 50 07.4	-75 32 53.8	2791
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A27	6 50 05.3	-75 32 56.1	2804
Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A28	6 50 05.6	-75 32 57.9	2811

Antioquia	Yarumal	Santa Isabel	L3	A29	6 50 05.0	-75 33 01.4	2816
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A30	6 48 57.9	-75 34 00.1	2717
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A31	6 48 57.3	-75 34 02.3	2720
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A32	6 48 57.7	-75 34 06.8	2713
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A33	6 48 55.0	-75 34 10.6	2696
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A34	6 48 53.0	-75 34 14.0	2680
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A35	6 48 48.6	-75 34 15.2	2661
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A36	6 48 45.9	-75 34 13.4	2660
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A37	6 48 43.7	-75 34 14.2	2664
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A38	6 48 41.7	-75 34 16.8	2675
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Samaria	L4	A39	6 48 39.2	-75 34 18.5	2674
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A40	6 43 37.3	-75 25 46.9	2659
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A41	6 43 33.5	-75 25 46.7	2666
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A42	6 43 30.4	-75 25 46.7	2672
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A43	6 43 27.1	-75 25 44.5	2679
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A44	6 43 16.2	-75 25 38.4	2692
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A45	6 43 13.8	-75 25 36.1	2691
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A46	6 43 09.1	-75 25 40.8	2682
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A47	6 43 01.1	-75 25 44.6	2676
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A48	6 42 42.7	-75 25 52.8	2676
Antioquia	Santa Rosa de Osos	Quitasol	L5	A49	6 42 24.2	-75 26 04.4	2676
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B1	5 27 52.3	-73 38 23.3	2893
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B2	5 27 54.2	-73 38 21.9	2915
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B3	5 27 56.5	-73 38 20.5	2947
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B4	5 27 59.3	-73 38 19.1	2973
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B5	5 28 01.9	-73 38 17.3	2978
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B6	5 28 05.5	-73 38 15.7	2981
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B7	5 28 08.8	-73 38 13.3	2986
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B8	5 28 13.8	-73 38 10.5	2984
Boyacá	Ráquira	Valero	L6	B9	5 28 16.3	-73 38 08.5	2978
Boyacá	Ráquira	Firita peña abajo	L6	B10	5 28 15.8	-73 38 05.0	2969
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B11	5 32 25.3	-73 40 33.6	2412

Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B12	5 32 24.8	-73 40 31.6	2418
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B13	5 32 22.5	-73 40 29.6	2423
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B14	5 32 21.0	-73 40 28.4	2426
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B15	5 32 20.5	-73 40 27.3	2426
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B16	5 32 22.6	-73 40 26.6	2427
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B17	5 32 20.9	-73 40 25.7	2420
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B18	5 32 22.4	-73 40 24.5	2425
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B19	5 32 23.8	-73 40 20.9	2430
Boyacá	Ráquira	Ollerías	L7	B20	5 32 25.4	-73 40 18.9	2433
Boyacá	Ráquira	Torres	L3	B21	5 30 27.9	-73 40 08.8	2632
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B22	5 30 30.3	-73 40 07.3	2640
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B23	5 30 32.8	-73 40 07.3	2645
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B24	5 30 34.6	-73 40 06.1	2650
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B25	5 30 36.1	-73 40 02.7	2656
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B26	5 30 38.0	-73 40 02.0	2655
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B27	5 30 42.6	-73 39 59.8	2652
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B28	5 30 45.0	-73 39 57.4	2659
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B29	5 30 48.4	-73 39 58.1	2666
Boyacá	Ráquira	Torres	L8	B30	5 30 51.1	-73 39 57.6	2670
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B31	5 31 10.9	-73 39 17.3	2518
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B32	5 31 11.1	-73 39 15.4	2509
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B33	5 31 12.4	-73 39 13.8	2497
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B34	5 31 10.2	-73 39 14.7	2495
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B35	5 31 10.2	-73 39 12.6	2488
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B36	5 31 11.4	-73 39 11.8	2480
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B37	5 31 08.8	-73 39 09.8	2479

Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B38	5 31 06.6	-73 39 09.1	2469
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B39	5 31 03.6	-73 39 07.5	2454
Boyacá	Ráquira	Torres	L9	B40	5 31 06.6	-73 39 05.1	2451
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B41	5 29 05.6	-73 39 51.5	2753
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B42	5 29 02.8	-73 39 50.3	2767
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B43	5 29 03.2	-73 39 46.9	2780
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B44	5 29 00.4	-73 39 48.9	2790
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B45	5 28 57.5	-73 39 50.5	2799
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B46	5 28 53.6	-73 39 50.7	2794
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B47	5 28 51.4	-73 39 48.4	2785
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B48	5 28 51.8	-73 39 46.7	2785
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B49	5 28 52.0	-73 39 43.4	2785
Boyacá	Ráquira	Valero	L10	B50	5 28 52.9	-73 39 40.9	2776
Santander	California	Pantanos	L11	S1	7 19 53.8	-72 56 13.8	2819
Santander	California	Pantanos	L11	S2	7 19 57.3	-72 56 14.7	2806
Santander	California	Pantanos	L11	S3	7 20 07.2	-72 56 14.8	2792
Santander	California	Pantanos	L11	S4	7 20 11.0	-72 56 15.2	2769
Santander	California	Pantanos	L11	S5	7 20 14.1	-72 56 15.6	2736
Santander	California	Pantanos	L11	S6	7 20 15.0	-72 56 14.1	2713
Santander	California	Pantanos	L11	S7	7 20 17.0	-72 56 14.8	2687
Santander	California	Pantanos	L11	S8	7 20 19.0	-72 56 13.3	2656
Santander	California	Pantanos	L11	S9	7 20 19.3	-72 56 14.6	2630
Santander	California	Pantanos	L11	S10	7 20 21.3	-72 56 12.9	2616
Santander	California	Angostura	L12	S11	7 22 44.7	-72 54 30.4	2973
Santander	California	Angostura	L12	S12	7 22 42.7	-72 54 32.7	2957
Santander	California	Angostura	L12	S13	7 22 40.9	-72 54 33.6	2938

Santander	California	Angostura	L12	S14	7 22 37.5	-72 54 34.1	2908
Santander	California	Angostura	L12	S15	7 22 34.1	-72 54 35.8	2879
Santander	California	Angostura	L12	S16	7 22 32.3	-72 54 35.9	2859
Santander	California	Angostura	L12	S17	7 22 30.7	-72 54 34.2	2834
Santander	California	Angostura	L12	S18	7 22 30.5	-72 54 30.6	2798
Santander	California	Angostura	L12	S19	7 22 30.2	-72 54 28.8	2781
Santander	California	Angostura	L12	S20	7 22 32.1	-72 54 26.1	2733
Santander	California	Baja	L13	S21	7 22 32.6	-72 53 56.0	2850
Santander	California	Baja	L13	S22	7 22 33.9	-72 53 54.5	2869
Santander	California	Baja	L13	S23	7 22 28.3	-72 53 52.7	2866
Santander	California	Baja	L13	S24	7 22 25.7	-72 53 53.9	2846
Santander	California	Baja	L13	S25	7 22 25.9	-72 54 00.7	2821
Santander	California	Baja	L13	S26	7 22 26.8	-72 54 08.0	2759
Santander	California	Baja	L13	S27	7 22 26.6	-72 54 11.1	2727
Santander	California	Baja	L13	S28	7 22 29.1	-72 54 11.7	2700
Santander	California	Baja	L13	S29	7 22 25.2	-72 54 17.9	2608
Santander	California	Baja	L13	S30	7 22 24.1	-72 54 20.4	2606
Santander	California	Baja	L14	S31	7 20 24.2	-72 55 38.3	2249
Santander	Vetas	Móngora	L14	S32	7 20 21.5	-72 55 33.0	2262
Santander	Vetas	Móngora	L14	S33	7 20 16.3	-72 55 27.6	2270
Santander	Vetas	Móngora	L14	S34	7 20 14.23	-72 55 23.78	2281
Santander	Vetas	Móngora	L14	S35	7 20 14.1	-72 55 18.0	2298
Santander	Vetas	Móngora	L14	S36	7 20 22.2	-72 55 07.2	2328
Santander	Vetas	Móngora	L14	S37	7 20 21.5	-72 55 02.3	2342
Santander	Vetas	Móngora	L14	S38	7 20 25.0	-72 54 59.4	2352
Santander	Vetas	Móngora	L14	S39	7 20 29.3	-72 54 56.6	2383

Santander	Vetas	Móngora	L14	S40	7 20 29.5	-72 54 52.5	2398
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S41	7 19 55.0	-72 54 52.8	2396
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S42	7 19 54.1	-72 54 54.1	2386
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S43	7 19 50.4	-72 55 00.9	2477
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S44	7 19 49.9	-72 55 01.1	2495
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S45	7 20 02.0	-72 55 15.5	2339
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S46	7 20 02.4	-72 55 14.7	2323
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	S47	7 20 03.1	-72 55 17.3	2311
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	SC48	7 20 02.4	-72 55 19.1	2305
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	SC49	7 20 02.5	-72 55 20.9	2325
Santander	Vetas	La Chorrera	L15	SC50	7 20 04.0	-72 55 21.4	2300
Santander	Charta	El Centro		VF1	7.266352	-72.89918	3641
Santander	Charta	El Centro		VF2	7.266939	-72.898209	3662
Santander	Charta	El Centro		VF3	7.265708	-72.899736	3679

Apéndice B Número de genotipos, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y valores de *p* de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg de los marcadores microsatélites utilizados por departamentos y con el total del muestreo. En negrita se resaltan los valores de *p* < 0.05 para los marcadores por fuera del equilibrio H-W.

Departamento	Locus	#Genot	Het. Obs	Het. Exp	p-value
Antioquia	VCC_S10	46	0.86957	0.66006	0.00000
	NA1040	49	0.42857	0.38081	0.09521
	NA800	46	0.26087	0.27592	0.15971
	M001	49	0.36735	0.68336	0.00000
	M002	49	0.20408	0.22449	0.53295
	M007	47	0.68085	0.59323	0.00892
	M008	48	0.27083	0.59781	0.00000
	M018	49	0.83673	0.50179	0.00000
	M010	46	0.02174	0.23196	0.00000
	M011	48	0.12500	0.25175	0.00381
Boyacá	VCC_S10	49	0.97959	0.75594	0.00000
	NA1040	50	0.34000	0.28505	0.32074
	NA800	50	0.02000	0.02000	100.000
	M001	48	0.27083	0.70263	0.00000
	M002	50	0.66000	0.64182	0.98094
	M007	50	0.52000	0.49576	100.000
	M008	49	0.20408	0.35430	0.00001
	M018	50	0.74000	0.53071	0.00097
	M010	49	100.000	0.50515	0.00000
M011	48	0.43750	0.36820	0.25116	
Santander	VCC_S10	50	0.66000	0.69838	0.00000
	NA1040	50	0.56000	0.41273	0.01310
	NA800	50	0.02000	0.02000	100.000
	M001	48	0.50000	0.84474	0.00000
	M002	49	0.10204	0.13402	0.20532
	M007	50	0.10000	0.37414	0.00000
	M008	50	0.26000	0.57636	0.00000
	M018	49	0.59184	0.51483	0.00479
	M010	50	0.82000	0.52384	0.00000
M011	50	0.54000	0.51737	0.01156	
Todos los individuos	VCC_S10	145	0.83448	0.77022	0.00000
	NA1040	149	0.44295	0.38580	0.34975
	NA800	146	0.09589	0.10589	0.07039
	M001	145	0.37931	0.82370	0.00000
	M002	148	0.32432	0.39299	0.06553
	M007	147	0.42857	0.71057	0.00000
	M008	147	0.24490	0.63999	0.00000
	M018	148	0.72297	0.51876	0.00000
	M010	145	0.62759	0.66491	0.00000
	M011	146	0.36986	0.40908	0.00298

Apéndice C Condiciones de amplificación de los marcadores para códigos de barras

Marcador	Paso	T °C	Tiempo	Ciclos
trnH-psbA	Desnaturalización inicial	98 °C	45 s	1
	Desnaturalización	98 °C	10 s	
	Hibridación	64 °C	30 s	35
	Extensión	72 °C	40 s	
	Extensión final	72 °C	10 s	1
matK	Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
	Desnaturalización	94 °C	30 s	
	Hibridación	52 °C	20 s	35
	Extensión	72 °C	50 s	
	Extensión final	72 °C	5 min	1
matk1	Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1
	Desnaturalización	94 °C	50 s	
	Hibridación	52 °C	1 min	40
	Extensión	72 °C	1 min	
	Extensión final	72 °C	10 min	1
matk2	Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
	Desnaturalización	94 °C	40 s	38
	Hibridación	48 °C	40 s	
	Extensión	72 °C	40 s	
	Extensión final	72 °C	7 min	1
matk3	Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1
	Desnaturalización	94 °C	30 s	
	Hibridación	53 °C	40 s	40
	Extensión	72 °C	40 s	
	Extensión final	72 °C	7 min	1
rbcl	Desnaturalización inicial			1
	Desnaturalización	95	30 s	
	Hibridación	50	20 s	35
	Extensión	72	1 min	
	Extensión final			
rbcl1	Desnaturalización inicial	95	2 min	1
	Desnaturalización	95	30 s	
	Hibridación	55	30 s	35
	Extensión	72	1 min	
	Extensión final	72	2 min	1
ycf	Desnaturalización inicial	94	4 min	1
	Desnaturalización	94	30 s	
	Hibridación	52	40 s	34
	Extensión	72	1 min	
	Extensión final	72	10 min	1
ITS	Desnaturalización inicial	94	5 min	1
	Desnaturalización	94	1 min	
	Hibridación	50	1 min	35
	Extensión	72	1.5 min	
	Extensión final	72	7 min	1