

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL EN ESPECIES
SEMIDOMESTICADAS: EL CASO DE LA UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)
EN EL NORORIENTE Y CENTRO DE COLOMBIA**

CLARA INÉS TÉLLEZ PACHECO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
2009**

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL EN ESPECIES
SEMIDOMESTICADAS: EL CASO DE LA UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)
EN EL NORORIENTE Y CENTRO DE COLOMBIA**

CLARA INÉS TÉLLEZ PACHECO

Trabajo de Investigación para optar el Título de Bióloga

DIRECTORA:

María Isabel Chacón Sánchez, PhD.

Botánica Agrícola

CODIRECTOR:

Genis Andrés Castillo Villamizar, BSc.

Biología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

2009

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	8
2. JUSTIFICACION	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. OBJETIVO GENERAL	12
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4. MARCO TEORICO	13
4.1. LA UCHUVA (PHYSALIS PERUVIANA L.).....	13
4.2. LA DOMESTICACIÓN	15
4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA	18
4.4. MARCADORES MOLECULARES.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. COLECTA DE GERMOPLASMA Y MATERIAL VEGETAL.....	21
5.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL	23
5.3. MARCADORES MOLECULARES.....	23
5.3.1. Amplificación Cruzada de Marcadores SSR en Uchuva.....	23
5.3.2. Amplificación de Marcadores ISSR en Uchuva.....	24
5.3.3. Amplificación de regiones no codificantes del ADN del Cloroplasto.....	25
5.3.4. Amplificación de la Región ITS en Uchuva	26
5.3.5. Limpieza y Preparación de las Muestras para Secuenciación	26
5.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	26
5.4.1. Análisis De La Diversidad Genética En Las Poblaciones De Uchuva.....	27
5.4.2. Estructura Poblacional	29
5.4.2.1. Índices de diferenciación poblacional	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. COLECTAS DE GERMOPLASMA.....	32
6.2. MARCADORES MOLECULARES.....	35
6.2.1. Amplificación Cruzada de Marcadores SSR en Uchuva.....	35
6.2.2. Amplificación de Marcadores ISSR en Uchuva.....	37
6.2.3. Amplificación de las Regiones del ADN del cloroplasto.....	38
6.3. ANÁLISIS DE DATOS.....	41
6.3.1. Diversidad Genética de Physalis peruviana.....	41
6.3.2. Estructura Poblacional	47
6.4. ASPECTOS EN RELACIÓN A LA SEMI-DOMESTICACIÓN	59
6.5. CONSIDERACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA UCHUVA EN COLOMBIA	61
7. CONCLUSIONES.....	63
8. AGRADECIMIENTOS.....	64
LITERATURA CITADA.....	65
ANEXOS.....	77

RESUMEN

Título: DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL EN ESPECIES SEMIDOMESTICADAS: EL CASO DE LA UCHUVA (*Physalis peruviana* L.) EN EL NORORIENTE Y CENTRO DE COLOMBIA*

Autor: Clara Inés Téllez Pacheco**

Palabras Claves: *Physalis peruviana*, Marcadores Moleculares, Diversidad Genética, Estructura poblacional.

Contenido: Conocer la diversidad y las relaciones genéticas que hay dentro y entre las poblaciones nos proporciona herramientas para comprender como se han llevado a cabo los procesos evolutivos dentro de las especies. En este estudio fue analizada la diversidad genética y la estructura poblacional de *Physalis peruviana*, una fruta promisoría para la economía del país, en poblaciones pertenecientes a los departamentos de Norte de Santander, Santander, Valle, Cundinamarca y Boyacá; esta especie se encuentra en proceso de domesticación, por lo que es importante conocer la reducción en la diversidad sobre las plantas cultivadas.

Durante el estudio se ensayaron cuatro tipos de marcadores moleculares: ADN del cloroplasto, ITS (espaciador no transcrito del ADN ribosomal), SSR e ISSR. Los resultados del estudio revelan altos niveles de diversidad dentro de las poblaciones tanto a nivel geográfico como a nivel de estatus biológico, también se evidenció una escasa estructura poblacional, medida mediante los índices Φ_{PT} , G_{ST} y N_{ST} .

Se realizaron análisis de agrupamiento (UPGMA, NJ) mediante la distancia euclidiana y la distancia genética de Nei (1978), en donde no se formaron grupo discretos, corroborando la baja estructura existente entre las poblaciones. La prueba de Mantel confirmó la baja relación que existe entre las poblaciones del estudio y su origen geográfico.

Los procesos de cultivo aún no han tenido efectos negativos sobre la diversidad de la especie en las zonas nororiental y central de Colombia, por el contrario se evidencia el intercambio genético que existe entre las poblaciones a nivel geográfico y también entre los tipos cultivado y no cultivado.

Hasta el momento no existe una reducción en la diversidad de las plantas cultivadas con respecto a las no cultivadas, lo cual es muy importante para los estudios de conservación y mejoramiento que se pueden llevar a cabo en la especie.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, María Isabel Chacón Sánchez - Genis Andrés Castillo Villamizar

ABSTRACT

TITLE: GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE IN SEMIDOMESTICATED SPECIES: THE GOLDENBERRY (*Physalis peruviana* L.) IN THE NORTHEAST AND CENTER OF COLOMBIA*

Author: Clara Inés Téllez Pacheco**

Keywords: *Physalis peruviana*, Molecular Markers, Genetic Diversity, Population Structure.

The knowledge about genetic relationships and diversity inside and among populations provides tools for understanding the evolutive process of species. In this research, we analyzed the genetic diversity and the population structure of *Physalis peruviana*, a promissory fruit for the Colombian economy, of samples collected from the departments of Norte de Santander, Santander, Valle, Cundinamarca and Boyacá. The understanding of the genetic reduction is important for this species, because *P. peruviana* is in course of domestication. For this research we assayed four classes of molecular markers: Chloroplast DNA, ITS, SSR and ISSR. Results reveal high levels of genetic diversity among populations. The population structure was measured through the rates: Φ_{PT} , G_{ST} y N_{ST} .

We realized cluster analysis (UPGMA, NJ) through the Euclidian distance and Nei's genetic distance (1978), but we do not found discrete groups. This supports the low level of population structure. The Mantel test did not show close relationships between populations and their geographic origin.

We conclude that the culture processes have not yet negative effects over the genetic diversity of species from the northeast and central zones of Colombia. By contrast, this research reveals a positive genetic exchange between populations at geographic level and between cultured and no cultured types. A reduction in the diversity of the cultured plants in respect to cultured plants was not observed; this finding is important for future researches on conservation and plant breeding.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, María Isabel Chacón Sánchez - Genis Andrés Castillo Villamizar

1. INTRODUCCION

La familia Solanácea contiene una gran variedad de especies ampliamente distribuidas, siendo la zona de los trópicos la que se encuentra mejor representada. Dentro de esta familia hay muchas especies domesticadas de gran importancia económica tales como la papa (*Solanum tuberosum*), el pimentón (*Capsicum annuum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), la belladona (*Atropa belladonna*), el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y la berenjena (*Solanum melongena*) entre otras. Dentro de esta familia también se encuentran algunas especies en proceso de domesticación, generalmente de importancia local (Volpato *et al.* 2004), y otras que se cultivaron ampliamente en épocas pasadas y que fueron posteriormente abandonadas (Harlan 1992; Gepts 2004). A pesar de que muchas especies de plantas se encuentran en estado intermedio de domesticación, poco es lo que se conoce acerca de cómo las actividades de cultivo han impactado la distribución y los niveles de diversidad genética. Entre estas especies de plantas cultivadas se encuentran varios frutales del Neotrópico en la familia de las Solanáceas. En Colombia tenemos el caso de la uchuva (*Physalis peruviana* L.), una planta que se cree originaria de los Andes y que fue ampliamente cultivada por los Incas (Legge 1974; Vietmeyer 1989) y posteriormente abandonada por lo que aún se encuentra en el proceso de domesticación.

La especie se encuentra pobremente representada en los bancos de germoplasma a nivel mundial. En el año 2000, el IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) reportó para Latinoamérica 12 entradas en el banco de germoplasma de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco en Perú (UNSAAC/CICA), 1 entrada en el CIRAD-FLOR, Station de Guadeloupe (Francia), 23 entradas en la estación experimental de Santa Catalina (DENAREF, INIAP) en Ecuador y 39 entradas en el Centro de Investigación La Selva, CORPOICA en Colombia (Knudsen 2000). En Europa, según la base de datos Europea para *Physalis* se encuentran 93 entradas, 5 accesiones en el Genbank am Institut fuer Pflanzengenetik und

Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Alemania; 1 accesión en el Botanical Garden of the University of Potsdam, Alemania; 17 accesiones en el Botanical Garden, University of Nijmegen, Holanda; 24 accesiones en el Institut National d'Horticulture, Francia; 1 accesión en el Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères, INRA Avignon, Francia y 41 accesiones en Generalidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Banco de Germoplasma, en España (Gil-Íñigo 2008). Finalmente, el Germplasm Resources Information Network en estados Unidos reporta 5 accesiones (USDA 2008). A pesar del valioso aporte que realizan estas colecciones al mantener y conservar el germoplasma de esta especie, se requieren más esfuerzos para aumentar las entradas y así poder aplicar biotecnología moderna y alcanzar objetivos de importancia socio-económica.

No solo las colecciones de germoplasma sino también los estudios básicos en este género son muy escasos (Baldwin & Speese 1951; Menzel 1951; Klinac 1986; Estrada & Martinez 1998; Peña-Lomelí 2001), sin embargo, para el caso particular de la especie se han incrementado en los últimos años (Ramadan & Mörsel 2003; da Costa-Chaves *et al.* 2005), en especial en Colombia, donde la gran perspectiva de crecimiento en la producción y comercialización de la fruta ha generado diversos estudios en el país a nivel agronómico y anatómico (Zapata *et al.* 2002; Collazos-Escobar 2006; Mazorra *et al.* 2006; Novoa *et al.* 2006; Salazar *et al.* 2007), palinológico (Lagos *et al.* 2005) y algunos estudios genéticos (Bonilla-Betancourt & Espinosa-Piedrahita 2003; Rodríguez & Bueno 2004; Ligarreto *et al.* 2005; Lagos *et al.* 2007). A pesar del incremento que se ha observado en cuanto a estudios se refiere, cabe destacar que en Colombia no existen colecciones sistemáticas de esta especie en diferentes estados biológicos de domesticación (ej. no cultivada o espontánea, cultivada tradicional, cultivada comercial, etc.), ni tampoco un estudio detallado sobre la influencia de las actividades de cultivo sobre la diversidad genética.

Las plantas domesticadas presentan una fuerte reducción en la diversidad genética con respecto a sus ancestros silvestres, esto se debe probablemente a procesos demográficos (ej. efecto fundador) y al intenso proceso de selección de los caracteres de interés agronómico (Ladizinsky 1998). Es por esto, que el

conocimiento de la diversidad genética es muy importante en el campo del mejoramiento de las especies cultivadas, en especial las que se encuentran en procesos de domesticación, como lo es la uchuva, pues facilita y guía los procesos de cruzamiento, conservación y selección de los individuos. Por otro lado, los estudios a nivel poblacional permiten evaluar los procesos evolutivos, así como el intercambio genético entre las poblaciones existentes.

El estudio de la diversidad genética está basado en el análisis de la variación entre individuos o poblaciones, por medio de herramientas como datos de pedigrí (Cox *et al.* 1986), datos morfológicos (Colunga-Garciamarin *et al.* 1996; Colunga-Garciamarin & May-Pat 1997), datos bioquímicos (análisis de isozimas) (Ivey & Richards 2001) y mas recientemente marcadores basados en datos de ADN.

En Colombia, no existen colecciones sistemáticas de esta especie en diferentes estados biológicos ni tampoco un estudio detallado sobre la influencia de las actividades de cultivo sobre la diversidad genética. La información generada por este tipo de estudios es crucial para la óptima conservación y aprovechamiento de los recursos fitogenéticos del Neotrópico

2. JUSTIFICACION

La Uchuva (*Physalis peruviana* L.) es una fruta fresca que se ha posicionado muy bien en el mercado Europeo y Norteamericano, convirtiendo a Colombia en su principal exportador, debido a su sabor mas dulce y mayor brillo en comparación con las producidas por otros países exportadores (Corporación Colombia Internacional, 2001). Según el Acuerdo de Competitividad de Productos Hortofrutícolas Promisorios Exportables de Colombia, firmado en el 2001, la uchuva constituye uno de los productos exportables de primera generación, en el año 2003 Colombia exportó 2,627 toneladas de uchuva fresca por un valor de 8,9 millones de dólares, por lo que se convirtió en la tercera fruta fresca de exportación en el país después del banano y el plátano (Espinell et al., 2005).

A pesar de su importancia, no se ha realizado una colecta sistemática ni estudios de diversidad genética de la uchuva Colombiana que permitan su buen uso y conservación. Expandir las colecciones *ex-situ* de uchuva cultivada y no cultivada para el estudio de la diversidad y estructura genética de la población es un paso importante para futuras actividades de conservación y utilización, así como para el mejoramiento del conocimiento a nivel molecular de las poblaciones de esta especie.

De otro lado, la investigación de las plantas en proceso de domesticación, como es el caso de la uchuva, ofrecen una gran oportunidad para evaluar el impacto que tienen las actividades de cultivo sobre la distribución y los niveles de diversidad genética, permitiendo la inferencia de los procesos evolutivos y la historia de las poblaciones, además, contribuye al conocimiento de cómo opera el proceso de domesticación sobre las especies.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar el impacto que sobre la diversidad genética han tenido las actividades de cultivo en la uchuva (*Physalis peruviana* L.) mediante marcadores moleculares.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Expandir las colectas de germoplasma *ex-situ* de uchuva cultivada y no cultivada disponibles en Colombia.

3.2.2. Evaluar la diversidad genética en la uchuva cultivada y no cultivada usando de marcadores del ADN nuclear.

3.2.3. Evaluar la diversidad genética de la uchuva cultivada y no cultivada utilizando de marcadores de ADN del cloroplasto.

3.2.4. Determinar las relaciones genéticas entre poblaciones de uchuva en diferentes estados de domesticación.

3.2.5. Evaluar los niveles de estructura poblacional de la uchuva de acuerdo a su estado de domesticación y a su origen geográfico.

4. MARCO TEORICO

4.1. La Uchuva (*Physalis peruviana* L.)

El género *Physalis* pertenece a la subfamilia Solanoideae en donde se encuentran géneros de importancia comercial como *Solanum* y *Capsicum*, sin embargo, *Physalis* se encuentra filogenéticamente más cercano a otros géneros como *Datura* y *Oryctes* según los estudios de Olmstead *et al.* (1999) (ver imagen 1). El género *Physalis* posee entre 75 y 90 especies todas nativas del nuevo mundo y con algunas especies de importancia comercial, la principal característica del género es su fruto que se encuentra encerrado en el cáliz. La filogenia del género no se encuentra bien definida, sin embargo, evidencia reciente, proveniente de secuencias ITS y *waxy*, sugiere que *P. chenopodifolia* y *P. nicandroides* podrían ser consideradas las especies más cercanas filogenéticamente a *P. peruviana* (Whitson & Manos 2005).

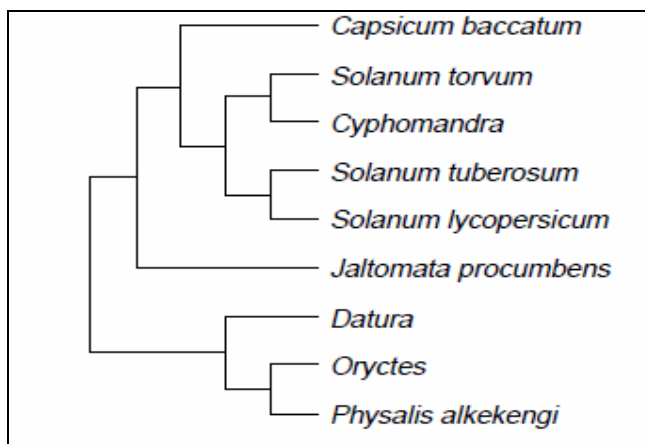


Imagen 1. Relación filogenética del género *Physalis* con otros géneros dentro de la subfamilia Solanoideae según la hipótesis propuesta por Olmstead *et al.* (1999) basado en datos de ADN del cloroplasto. Figura tomada de Olmstead *et al.*, (1999).

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es una planta de la región andina, siendo esta región su centro de origen y diversificación (Medina, 1991). Actualmente, la uchuva se encuentra distribuida en zonas tropicales y subtropicales entre los

1500 y 3000 m.s.n.m., incluyendo zonas de introducción como son Malasia, China y el Caribe, entre otras (Corporación Colombia Internacional 2001).

La especie fue introducida en África e India, existiendo en el momento cerca de 80 ecotipos a nivel mundial, en Colombia se cultivan 3 de ellos: Kenia, Sudáfrica y Colombia, cuyos nombres corresponden al país de procedencia (Villamizar *et al.* 1993). El ecotipo colombiano se caracteriza por tener una mejor coloración y un mayor contenido de azúcares, características que la hacen mas apetecible en los mercados extranjeros (Fisher *et al.* 2000).

En Colombia la uchuva es producida principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia (Corporación Colombia Internacional 1999; Zapata *et al.* 2002; Espinal *et al.* 2005), aunque es una fruta que se ha cultivado artesanalmente, en los últimos años ha cobrado una gran importancia comercial, debido a la apertura de los mercados Europeos y Norte Americanos para la exportación. Colombia se ha ubicado como el principal productor a nivel mundial debido a la mejor calidad del fruto, a su mayor brillo y sabor más dulce en comparación con otros países exportadores (Corporación Colombia Internacional 2001), esto ha conducido al mejoramiento y tecnificación de los cultivos. Según el Acuerdo de Competitividad de Productos Hortofrutícolas Promisorios Exportables de Colombia, firmado en el 2001, la uchuva constituye uno de los productos exportables de primera generación, en el año 2003 Colombia exportó 2,627 toneladas de uchuva fresca por un valor de 8,9 millones de dólares, por lo que se convirtió en la tercera fruta fresca de exportación en el país después del banano y el plátano (Espinal *et al.* 2005).

Las flores de *P. peruviana* son pentámeras, hermafroditas, solitarias y pedunculadas, se encuentran ubicadas en las axilas de las ramas, la corola es gamopétala con simetría radiada, regular o actinomorfa, de color amarillo y con manchas en las partes intermedias de los pétalos; el cáliz es gamosépalo, de color verde oscuro, pubescente y con las venas moradas, éste cubre el fruto durante todo su desarrollo, inicialmente es de color verde pero a medida que va madurando el fruto, el color se va tornando dorado; el pistilo esta compuesto por el ovario, el estilo y el estigma, el ovario es súpero y de color amarillo-

verdoso a verde, el estilo es de color morado y remata en un estigma amarillo-verdoso; el androceo esta compuesto por la antera y el filamento, las anteras son de color verde oscuro a morado, oblongas, biloculadas con dehiscencia lateral y los filamento son glabros y adnados (Lagos 2006). El fruto es una baya carnosa en forma de globo que se encuentra cubierta por el cáliz, este lo preteje contra insectos, pájaros, patógenos y condiciones climáticas extremas (Corporación Colombia Internacional 2001).

Además de los altos contenidos de vitaminas A y C, del hierro y el fósforo que posee este fruto, se le atribuyen propiedades medicinales tales como la purificación de la sangre, disminución de la albúmina en los riñones, alivio de problemas en la garganta, fortificación del nervio óptico, limpieza de las cataratas, calcificación y control de la amibiasis (Corporación Colombia Internacional 2001).

Sin duda, la Uchuva (*Physalis peruviana*) es una de las especies más promisorias con fines de exportación; sin embargo, la colección, caracterización y evaluación de germoplasma de esta especie es escasa.

En la actualidad se adelantan diversos proyectos en el país encaminados al conocimiento y conservación de los recursos genéticos, no solo de *P. peruviana*, sino de otras especies, permitiendo identificar diferentes plantas promisorias de interés agrícola o industrial que contribuyen al desarrollo del país.

4.2. La Domesticación

La domesticación de plantas es un proceso que comenzó hace aproximadamente 10,000 años en varios centros alrededor del mundo, los centros de origen mas aceptados en la actualidad son: Mesoamérica, los Andes, la creciente fértil, Africa (Etiopia y Sáhel), el Sureste de China y el Sureste de Asia (Harlan 1992; Smartt & Simmonds 1995, Gepts, 2004).

En la actualidad, se consideran cuatro centros independientes para el continente Americano, el Este de Norteamérica, Mesoamérica, la región Andina y las tierras bajas tropicales de Suramérica (Pickersgill 2007).

En la zona del Este de Norteamérica se ha registrado la domesticación de cuatro especies *Chenopodium berlandieri* spp. *jonesianum*, *Iva annua*, *Helianthus annuus* y *Cucurbita pepo* spp. *ovifera* (Smith 2006), en las zonas bajas tropicales de Suramérica se registran 3 especies: *Capsicum chinense* (Pickersgill 2006), *Manihot esculenta* (Chandler-Ezell et al. 2006; Dickau et al. 2007) y *Arachis hypogaea* (Dillehay et al. 2007), estos dos centros presentan un número de especies domesticadas muy bajo en relación con los otros dos centros.

La zona Mesoamericana se ha señalado como centro de domesticación de diversas especies entre las que se encuentran *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus vulgaris* (Kaplan & Lynch 1999), *Canavalia ensiformis*, *Amaranthus cruentus*, *Gossypium hirsutum* (Pickersgill & Heiser 1977), *Zea mays* (Piperno & Flannery 2001) y *Cucurbita pepo* spp. *pepo* (Smith 2005) entre otras; en la zona Andina también se llevo a cabo la domesticación de una gran diversidad de especies, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas* (Pickersgill 2006), *Amaranthus caudatus*, *Canna edulis*, *Capsicum baccatum* (Pickersgill & Heiser 1977), *Cucurbita maxima*, *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita moschata* (Merrick 1995), entre otras.

La domesticación de las plantas es un proceso co-evolutivo en el que el hombre selecciona el germoplasma, dando lugar a cambios genéticos en las poblaciones que favorecerán a los humanos (Harlan 1992; Harlan 1995; Clement 1999; Diamond 2002), existen dos tipos de selección asociadas a este proceso, la selección conciente o intencional en la que los cultivadores seleccionan deliberadamente los rasgos de interés y la selección inconciente o automática en la que la planta es movida de su hábitat original, lo que generará cambios en la ecología que conlleva a cambios drásticos en las presiones de selección (Zohary 2004).

Las plantas domesticadas comparten un conjunto de caracteres morfológicos y fisiológicos que los diferencian de sus progenitores, a estos caracteres los conocemos como el síndrome de la domesticación (Harlan 1992; Frary & Doganlar 2003). La pérdida de la dispersión de las semillas y la dormancia es uno de los principales rasgos de este síndrome, la retención de las semillas varía con la especie; la pérdida de la dormancia previene una germinación prematura, además de contribuir a la germinación simultánea de la población, para obtener una cosecha uniforme. Por lo general las plantas domesticadas presentan un hábito de crecimiento mas compacto, lo que conlleva a cambios en la arquitectura de la planta, un claro ejemplo de este rasgo es el maíz (*Zea mays*), esta característica incrementa la productividad de las cosechas. Los cambios en el sistema reproductivo también constituyen un rasgo importante del síndrome, estos cambios están dirigidos hacia la reproducción vegetativa, la cual asegura la “reproducción” bajo condiciones favorables, el mantenimiento de las características seleccionadas y mayor apetencia por los frutos, un ejemplo es la banana, la cual ha eliminado las semillas del fruto. El rendimiento es incrementado en las plantas de tipo domesticado con respecto a sus silvestres, sumado a esto los órganos cosechados aumentan su tamaño notablemente (ej. el tomate).

Las poblaciones de plantas sufren un proceso de transición desde el estado silvestre al estado domesticado, pasando por varias etapas, Clement (1999) define 5 estados:

- Silvestre: Población natural cuyos genotipos y fenotipos no han sido modificados por la intervención humana
- Co-Evolucionados Incidentalmente: Población que voluntariamente se adapta a un ambiente con intervención humana que posiblemente conlleva cambios genéticos pero sin selección por parte del hombre.
- Incipientemente Domesticado: Población que ha sido modificada por selección e intervención humana, pero cuyos fenotipos se encuentran aún dentro del rango de variación encontrado en las poblaciones silvestres para los rasgos sujetos a selección
- Semi-Domesticados: Población que ha sido modificada significativamente por la selección e intervención humana, pero cuyos

fenotipos divergen del rango de variación encontrado en las poblaciones silvestres para los rasgos sujetos a selección.

- Domesticados: Población similar a la semi-domesticada, pero cuya adaptabilidad ecológica ha sido reducida al punto de que solo puede sobrevivir a ambientes creados por el hombre, es decir ambientes cultivados.

Las plantas domesticadas presentan una fuerte reducción en la diversidad genética con respecto a sus ancestros silvestres, esto se debe probablemente a procesos demográficos (ej. efecto fundador) y al intenso proceso de selección de los caracteres de interés agronómico (Ladizinsky 1998). Es por esto, que el conocimiento de la diversidad genética es muy importante en el campo del mejoramiento de las especies cultivadas, en especial las que se encuentran en procesos de domesticación, como lo es la uchuva, pues facilita y guía los procesos de cruzamiento, conservación y selección de los individuos. Por otro lado, los estudios a nivel poblacional permiten evaluar los procesos evolutivos, así como el intercambio genético entre las poblaciones existentes.

4.3. Diversidad Genética

La biodiversidad es la propiedad que poseen los seres vivos de ser variados, como componentes de esta diversidad biológica encontramos la diversidad genética, la diversidad de especies y la diversidad ecológica.

La diversidad genética es la variación de los genes dentro de una especie, bien sea dentro de una población o entre varias poblaciones. Esta diversidad genética mantiene una variedad de condiciones de respuesta al medio, que permitirán a la especie responder y adaptarse a los cambios que presente el entorno, de esta forma la variación contribuirá a la capacidad de las comunidades ecológicas a resistir o recuperarse de cambios ambientales o disturbios en el hábitat, por lo tanto, la diversidad genética es la base fundamental de la evolución, que le permite a las especies la adaptación y con ello la sobrevivencia.

La domesticación es un tipo de selección artificial conducido por el hombre que ha dado origen a diferentes formas, razas y variedades domésticas. Este tipo de especies han sido fundamentales para la sobrevivencia del hombre, sin embargo estas presiones de selección han llevado a la reducción de la diversidad genética de estas poblaciones.

4.4. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares correspondientes a secuencias de ADN se clasifican en dos grandes grupos, los que provienen del ADN nuclear y los que provienen del ADN organelar (cloroplástico y mitocondrial). El ADN cloroplástico es exclusivo de las plantas y se transmite de una forma uniparental, no-mendeliana, es decir, es un genoma haploide, razón por la cual es muy útil en la genética de poblaciones. El genoma del cloroplasto es de aproximadamente 120 a 220 kb y es circular (Palmer 1987), se encuentra altamente conservado en tamaño y estructura. Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta a la hora de escoger este tipo de marcador es la adecuada selección de la región o regiones a analizar, ya que éstas deben poseer variación alélica (Parker *et al.* 1998). Debido a la conservación en el arreglo de los genes dentro de la molécula se han diseñado numerosos cebadores “consenso” o “universales”, que facilitan los estudios de diversidad genética; a nivel poblacional los cebadores “universales” que amplifican regiones no codificantes del ADN del cloroplasto son muy útiles ya que permiten amplificar una pequeña región para secuenciación directa (Petit *et al.* 1996).

Los marcadores microsatélites, también llamados SSR (Simple Sequence Repeats) están compuestos de unidades repetidas de 2 a 6 pares de bases, son hipervariables y de carácter codominante, estos marcadores son una herramienta muy útil en estudios poblacionales debido a que un solo locus puede llegar a tener 11 alelos (*Polaskia chichipe*) (Otero-Arnaiz *et al.* 2005); 13 alelos (*Vitis vinifera*) (Martínez *et al.* 2006) y hasta 18 alelos (Sorgo) (Abu Assar *et al.* 2005). Sin embargo, la identificación de estas regiones es costosa y

requiere de tiempo, por ello la mayoría de los estudios se llevan a cabo con regiones previamente identificadas en la especie de interés. Debido a estos motivos, en los últimos años se ha recurrido a la amplificación cruzada de microsatélites, es decir, microsatélites diseñados en una determinada especie que se prueban en otras especies cercanas, bien sea del mismo género (Cipriani *et al.* 1999; Roa *et al.* 2000; Zhebentyayeva *et al.* 2003; Mottura *et al.* 2005; Gao *et al.* 2005; Vignes *et al.* 2006; Palma-Silva *et al.* 2007; Lemes *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008) o de la misma familia (Peakall *et al.* 1998; Aldrich *et al.* 2003; Gutierrez *et al.* 2005).

Los marcadores ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) fueron introducidos en 1994 (Zietkiewicz *et al.* 1994) y a pesar de su carácter dominante, su uso se ha extendido a las investigaciones de la genética de poblaciones (Esselman *et al.* 1999; Culley & Wolfe 2001) por su naturaleza hipervariable, bajo costo y facilidad de lectura del bandeo (Wolfe *et al.* 1998). Esta herramienta es comúnmente utilizada en plantas ya que diversos estudios han mostrado que es un sistema simple y fiable, que además tiene alta reproducibilidad y abundantes polimorfismos (Prevost & Wilkinson 1999; Bornet & Branchard 2001; Bornet *et al.* 2002a; Bornet *et al.* 2002b; Panda *et al.* 2003; Djè *et al.* 2006). La aplicación de los marcadores moleculares para el estudio de un cultivo promisorio como lo es la uchuva facilitará el estudio de su diversidad y consecuentemente tendrá grandes aplicaciones en estrategias de conservación, mejoramiento y manejo de recursos genéticos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Colecta de Germoplasma y Material Vegetal

Las colectas fueron realizadas en los departamentos de Santander, y Norte de Santander durante el período comprendido entre los meses de Agosto de 2006 y Abril de 2007. También se recibió la colaboración de un proyecto llevado a cabo en la Universidad Nacional de Colombia cuyas colectas se efectuaron en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca durante los meses de Noviembre y Diciembre de 2006. Además se obtuvieron cuatro individuos provenientes del trabajo de investigación realizado en la Universidad Nacional de Palmira (Bonilla-Betancourt & Espinosa-Piedrahita 2003) de los departamentos de Valle, Nariño y Cundinamarca, una muestra de la estación experimental de Tenerife (CIAT) y una muestra proveniente de Ecuador que aunque no posee datos completos de pasaporte se usó para fines de comparación. El material colectado consistió de folíolos jóvenes, que fueron usados para la extracción de ADN; frutos maduros, utilizados para la extracción de germoplasma y muestras de herbario.

La selección de los sitios de colecta fue efectuada teniendo en cuenta la altura a la que se encuentra la especie (1500 a 3000 m), la información del herbario de la Universidad Industrial de Santander y a previas averiguaciones en las plazas de mercado de la ciudad de Bucaramanga sobre la procedencia de los frutos vendidos allí. Una vez ubicados los posibles sitios de muestreo, se analizó la situación de orden público de las zonas. Durante la fase de campo se acudió a la comunidad en general para obtener información acerca de la presencia de plantas no cultivadas (ej. A orillas de camino, en jardines caseros, en huertos, etc.), así como la ubicación de los cultivos en la zona.

Las plantas muestreadas se clasificaron en dos grupos según su estado biológico, definido de la siguiente manera:

- No Cultivadas: Aquellas plantas que crecen en áreas con cierto grado de perturbación humana como son orillas de las carreteras, márgenes del bosque, márgenes de campos de cultivo, huertos ó jardines caseros, y que no han sido cultivadas intencionalmente.
- Cultivadas: Aquellas plantas que han sido intencionalmente cultivadas y que crecen en fincas al cuidado del hombre. Dentro de esta categoría se encuentran aquellas que son explotadas comercialmente.

El registro del estado biológico de las plantas es muy importante para el estudio, ya que la comparación de la diversidad entre los dos estados nos permitirá evaluar el efecto que ha tenido el proceso de cultivo sobre la especie. Para efectos de este estudio las accesiones fueron tomadas como poblaciones, entonces, las plantas que se encontraban a menos de un kilómetro de distancia se ubicaron en la misma accesión, es decir, fueron tomadas como parte de una misma accesión.

La información de cada entrada se recopiló en el formato IPGRI para colecta de material vegetal (Anexo A), que incluyó entre otros, datos de coordenadas, descripción del sitio de colecta, material colectado, situación de la planta y fuente de muestreo. En el Anexo B se presenta un resumen de la información recopilada para cada accesión. En la Tabla 1 se muestran las accesiones utilizadas en este estudio para el análisis de diversidad genética.

Los folíolos colectados fueron almacenados en papel aluminio estéril en bolsas de cierre hermético con sílica gel y conservados a una temperatura de -70°C.

Los frutos colectados se conservaron en bolsas de papel hasta que estuvieron totalmente maduros, entonces se extrajeron las semillas que serán depositadas en el banco de germoplasma de CORPOICA (el Acuerdo de Transferencia de Material está en trámite).

5.2. Extracción de ADN Genómico Total

El ADN genómico total se extrajo de un total de 152 individuos pertenecientes a un total de 73 accesiones a partir de folíolos jóvenes. La extracción de los individuos se realizó según el método mini CTAB (Doyle & Doyle 1987), que consta de tres pasos fundamentales: pulverización del material vegetal, separación del ADN de otros compuestos orgánicos celulares y precipitación del ADN (Anexo C). La visualización del ADN se realizó en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X con bromuro de etidio, se corrieron 5 μ L del ADN total para observar la calidad y realizar la cuantificación, esta última se hizo por comparación con un marcador de peso molecular de 100 bp. (Fermentas). El ADN concentrado se conservó a -70°C.

5.3. Marcadores Moleculares

5.3.1. Amplificación Cruzada de Marcadores SSR en Uchuva

Con el fin de identificar marcadores tipo microsatélite en uchuva, se recurrió a la estrategia de la amplificación cruzada de marcadores SSR provenientes de cuatro especies solanáceas debido a que no se dispone en la actualidad de marcadores SSR específicos y por motivos logísticos no fue posible desarrollarlos dentro de este estudio. Los microsatélites probados fueron escogidos teniendo en cuenta la cercanía filogenética de la especie fuente con la especie de estudio (Olmstead *et al.* 1999), *Solanum* y *Capsicum* son los géneros más cercanos en los que se han diseñado SSRs. En total se evaluaron 94 regiones microsatélites por amplificación cruzada, 8 regiones SSR diseñadas en *Physalis philadelphica* (Chacón, 2006, Comunicación Personal); 23 regiones SSR diseñadas en *Capsicum annuum* (Sanwen *et al.* 2000; Yi *et al.* 2006; Portis *et al.* 2007), 60 regiones diseñadas para *Solanum tuberosum* L. y 3 regiones diseñadas para *Solanum lycopersicum* (Anexo D).

Inicialmente se realizaron las pruebas de estandarización de las condiciones PCR en una muestra representativa de *Physalis peruviana* L., se probaron

gradientes de concentración de $MgCl_2$, *Taq* polimerasa, cebadores y temperatura de anillamiento. Las reacciones PCR (Polymerase Chain Reaction) se realizaron en un volumen de 12.5 μ L que consistieron de 5 a 10ng de ADN genómico total, 0.2mM de cada desoxi nucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.5 μ M de cada cebador, 1X de buffer *Taq* polimerasa, 0.5U de *Taq* polimerasa (Fermentas) y 1.5mM de $MgCl_2$. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador PTC-100TM (MJ Reserch, Inc) bajo las siguientes condiciones: Calentamiento inicial de 94°C por 4 minutos (para desnaturalizar la molécula de ADN); 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto para la temperatura de anillamiento que fue diferente para cada región (Tabla 2) y 2 minutos a 72°C de extensión. El último ciclo es seguido por 5 minutos de extensión final del producto a 72°C.

Los marcadores SSR que se lograron amplificar consistentemente en uchuva, fueron evaluados en un conjunto de 67 individuos pertenecientes a 30 accesiones, los cuales fueron escogidos teniendo en cuenta su estado de domesticación (cultivado versus no cultivado) y procedencia geográfica (Tabla 1). Los tamaños alélicos se determinaron en geles de poliacrilamida cuya visualización se hizo por medio de la técnica de tinción en plata. En el Anexo E se describe el protocolo utilizado.

5.3.2. Amplificación de Marcadores ISSR en Uchuva

Inicialmente, se evaluaron 13 marcadores ISSR obtenidos de la University of British Columbia en Vancouver, Canadá (Tabla 3) en una muestra representativa de *Physalis peruviana* L., en los que se estandarizó la reacción de PCR mediante gradientes de concentración de $MgCl_2$, *Taq* polimerasa, cebadores y temperatura de anillamiento. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 15 μ L que consistieron de 5 a 10ng de ADN genómico total, 0.2mM de cada desoxi nucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.5 μ M del cebador, 1X de buffer *Taq* polimerasa, 1U de *Taq* polimerasa (Fermentas) y 1.5mM de $MgCl_2$. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador 96-well MyCycler (BIORAD) bajo las siguientes condiciones: Calentamiento inicial de 94°C por 90 segundos (para desnaturalizar la molécula

de ADN); 45 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 45°C para el anillamiento y 90 segundos a 72°C de extensión. El último ciclo es seguido por 10 minutos de extensión final del producto a 72°C. Los productos PCR fueron visualizados en geles de agarosa en TBE 0.5X al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Cada banda obtenida se evaluó de forma independiente, es decir como un locus y los polimorfismos se evaluaron por presencia o ausencia de bandas. Las diferencias cualitativas de las bandas no fueron tenidas en cuenta (Assefa *et al.* 2003). Los loci que lograron ser amplificados consistentemente en la muestra representativa fueron evaluados en un conjunto de 67 individuos pertenecientes a 30 accesiones, escogidas teniendo en cuenta su estado de domesticación (cultivado versus no cultivado) y procedencia geográfica (Tabla 1).

5.3.3. Amplificación de regiones no codificantes del ADN del Cloroplasto

Inicialmente se realizó un estudio piloto de polimorfismos con una muestra representativa de *Physalis peruviana* L. en donde se evaluaron 11 regiones no codificantes del ADN del cloroplasto (cpADN), entre ellos 9 espaciadores intergénicos y 2 intrones (Anexo F).

En primer lugar se procedió a la estandarización de las condiciones PCR para cada región de estudio mediante gradientes de concentración de MgCl₂, *Taq* polimerasa, cebadores y temperatura de anillamiento. Las reacciones PCR se realizaron en un volumen de 25µL que consistieron de 5 a 10ng de ADN genómico total, 0.2mM de cada desoxi nucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.5µM de cada cebador, 1X de buffer *Taq* polimerasa, 0.5U de *Taq* polimerasa y la concentración del MgCl₂ fue diferente para cada región (Tabla 4). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador PTC-100™ (MJ Reserch, Inc) bajo las siguientes condiciones: Calentamiento inicial de 94°C por 4 minutos (para desnaturalizar la molécula de ADN); 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto para la temperatura de anillamiento que fue diferente para cada región (Tabla 4) y 2 minutos a 72°C de extensión. El último ciclo es seguido por 10 minutos de extensión final del producto a 72°C.

Los productos PCR, se corrieron en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5X en donde se visualizó la calidad del producto obtenido. Se escogieron los productos con mejor señal, los cuales se purificaron y se secuenciaron. Durante el estudio piloto se enviaron a secuenciar muestras correspondientes a las 9 regiones no codificantes del cloroplasto, con lo que se obtuvo el tamaño de estas regiones para la especie. Sin embargo, el estudio no se pudo ampliar para las nueve regiones en el resto de los individuos ya que no todas ellas lograron ser consistentemente amplificadas en la muestra. Por estos motivos, solo las regiones *rps14 – psaB*, *trnL* intron y *trnS – trnG* se secuenciaron en un individuo de cada una de las 30 accesiones escogidas para el estudio (Tabla 1).

5.3.4. Amplificación de la Región ITS en Uchuva

Se realizaron pruebas de amplificación del espaciador interno transcrito del ADN ribosomal (ITS) (Anexo F) con varias combinaciones de cebadores (ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS3/ITS4, ITS5/ITS2 e ITS5/ITS4) (White *et al.* 1990), para lo cual se ensayaron gradientes de temperatura de anillamiento, concentración de $MgCl_2$, *Taq* polimerasa y de cebador, sin resultados positivos.

5.3.5. Limpieza y Preparación de las Muestras para Secuenciación

La purificación de las muestras fue realizada usando el kit Wizard SV PCR Clean-up System de Promega, siguiendo el protocolo que trae consigo el kit. El servicio de secuenciación usado fue el de la compañía MACROGEN INC. (Korea), en donde, en algunas ocasiones, también se utilizó el servicio de purificación de muestras.

5.4. Análisis de Datos

De acuerdo a los objetivos planteados se conformaron tres tipos de agrupaciones a partir de las accesiones usadas en el estudio. En la primera agrupación, se tuvo en cuenta el estatus biológico de la accesión, en el que se ubican 2 sub-grupos: Cultivado y No Cultivado, que permitirá medir el efecto del proceso de cultivo sobre la especie. Las otras dos agrupaciones tienen en cuenta el sitio de origen de la accesión por departamentos y por regiones, respectivamente, en los que se evaluará la relación del origen geográfico con la diversidad genética. En la agrupación por departamentos se ubicaron 5 subgrupos: Norte de Santander, Santander, Cundinamarca, Boyacá y Valle y en la agrupación por regiones se ubicaron 3 subgrupos: Oriente (Norte de Santander y Santander), Centro (Cundinamarca y Boyacá) y Sur (valle y Nariño). Cada subgrupo se tomará como una población en los análisis subsecuentes.

5.4.1. Análisis De La Diversidad Genética En Las Poblaciones De Uchuva

La edición y alineamiento de las secuencias se hizo a través del programa BIOEDIT (Hall 1999). Con las secuencias provenientes de las tres regiones de ADN del cloroplasto se construyó una matriz única de datos que fue analizada con el programa DNAsp (Rozas *et al.* 2003) en el que se calculó el número de sitios segregantes (S), la diversidad haplotípica (Hd) y la diversidad nucleotídica (Pi) para cada grupo conformado y para el total de las accesiones. En la imagen 2 se presenta un gel de agarosa en el que se aprecian amplificadores pertenecientes a las tres regiones del genoma del cloroplasto que fueron analizadas en este estudio, en la imagen se puede apreciar el peso molecular de cada una de las regiones.

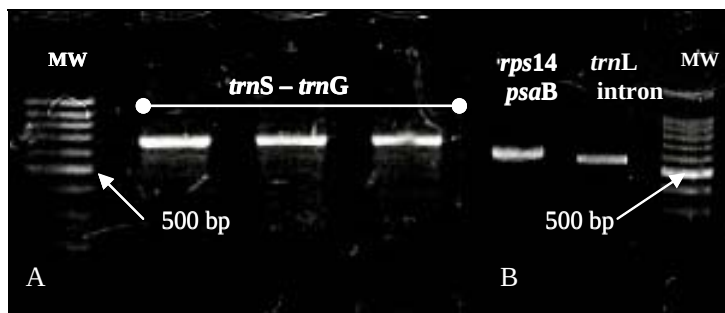


Imagen 2. Geles de agarosa al 1% en el que se muestran productos de PCR de las tres regiones de ADN del cloroplasto analizadas en este estudio. MW: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (bp). La banda correspondiente a 500 bp se señala con una flecha. A. Productos de PCR de la región *trnS-trnG*; los individuos amplificados de izquierda a derecha son: 06Uch0002-1, 06Uch0026-1 y 06Uch0049. B. Productos de PCR del espaciador intergénico *rps14-psaB* y del *trnL* intron; los individuos amplificados de izquierda a derecha son: 06Uch0030 y 06Uch0066.

Las bandas obtenidas de la amplificación de las regiones ISSR se leyeron como presencia (1) y ausencia (0) y a partir de estos datos se generó una matriz donde cada banda equivale a un locus. Las bandas evaluadas se escogieron por la consistencia presentada en las amplificaciones. En la imagen 3 se observa un gel en el que se muestran algunos amplificados de la región ISSR 845.

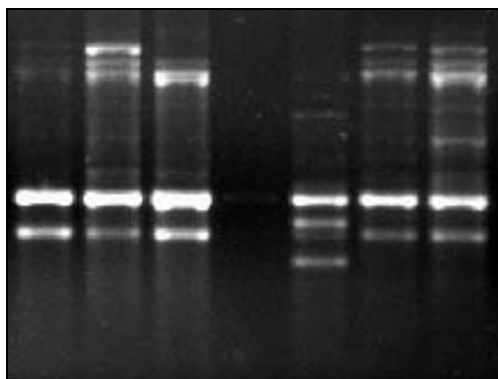


Imagen 3. Gel de agarosa al 2% en el que se observa la amplificación de loci ISSR en algunos individuos con el cebador #845; los individuos amplificados de izquierda a derecha son 06Uch0070-2, 06Uch0070-3, 06Uch0071-1, 06Uch0071-2, 06Uch0071-3, 06Uch0073, UNP0016.

A partir de la matriz de datos ISSR generada se describió la diversidad genética como el porcentaje de loci polimórficos (P) y se cuantificó mediante el índice de Shannon (I) (Shannon & Weaver 1949) usando el programa GENALEX (Peakall & Smouse 2006), el cual asume Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) y la heterocigosidad promedio (H_B) esperada bajo el supuesto de panmixia, por medio de una aproximación bayesiana que no asume EHW (Zhivotovsky 1999; Holsinger *et al.* 2002) implementada en el software HICKORY (Holsinger & Lewis 2003). Para este propósito se usó la opción “free model” con los parámetros (burning = 5000, sample = 25000, thin = 5).

La reducción de la diversidad genética ($\%r$) en la población de plantas cultivadas con relación a las no cultivadas se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\%r = \frac{D_{NC} - D_C}{D_{NC}}$$

Donde D_{NC} es la diversidad genética en la uchuva no cultivada y D_C es la diversidad genética en la uchuva cultivada.

5.4.2. Estructura Poblacional

5.4.2.1. Índices de diferenciación poblacional

La diferenciación genética entre los grupos (para las tres configuraciones grupales descritas al inicio de esta sección) se evaluó mediante el índice de diferenciación Φ_{PT} (calculado vía AMOVA) para los datos ISSR, el cual es un índice análogo al F_{ST} pero de aplicación a datos binarios y haploides (Peakall *et al.* 1995). El nivel de significancia del índice de diferenciación se evaluó a través de 999 permutaciones aleatorias, estos cálculos se hicieron a través del programa GENALEX (Peakall & Smouse 2006).

Para los datos de secuencias del $cpADN$, la diferenciación entre las poblaciones se calculó mediante el índice de diferenciación Φ_{PT} (calculado vía AMOVA) con el programa GENALEX (Peakall & Smouse 2006) y mediante los índices de diferenciación G_{ST} (Nei 1973) y N_{ST} (Lynch & Crease 1990) con su

respectivo flujo génico (N_m) mediante el software DNAsp (Rozas *et al.* 2003). El índice G_{ST} toma en cuenta las frecuencias de los haplotipos o alelos presentes en las poblaciones, mientras que el N_{ST} toma en cuenta, además, las distancias genéticas entre los haplotipos o alelos presentes en las poblaciones, por lo cual su comparación puede ser informativa acerca de la estructura genética y filogeográfica de la población analizada (Pons & Petit 1996).

5.4.2.2. Distancias Genéticas y Aislamiento por Distancia

Las relaciones genéticas entre los individuos se evaluaron a partir de los datos obtenidos de los marcadores ISSR. Para este fin, se calculó la distancia genética de Nei (Nei 1978) y la distancia geométrica euclidiana. A partir de cada matriz obtenida se construyó un dendrograma con los algoritmos de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) y NJ (Neighbor Joining). El soporte de los grupos se determinó mediante análisis bootstrap (1000 permutaciones), estos cálculos se implementaron en el programa PAST (Hammer *et al.* 2001).

Patrones de aislamiento por distancia pueden generarse si existe un flujo limitado de genes (individuos, semillas, polen, etc.) dentro y entre poblaciones, lo cual puede resultar en patrones de estructura geográfica a diferentes escalas (ej. dentro de poblaciones, dentro de regiones, etc.). En este contexto, la correlación entre la divergencia genética (basada en Φ_{PT} para datos ISSR) y la distancia geográfica entre las poblaciones (en este caso definidas por departamento) fue evaluada mediante la prueba de Mantel. El centro geográfico para cada departamento fue calculado promediando las coordenadas geográficas (latitud y longitud) de los individuos, y con estos datos se calculó una matriz de distancias geográficas en Km entre cada par de poblaciones (para estos análisis se excluyó el departamento del Valle debido al bajo tamaño de la muestra) a través del programa en línea GREAT CIRCLE CALCULATOR (<http://www.gb3pi.org.uk/great.html>). Por otro lado se construyó una matriz de divergencia genética entre pares de poblaciones (departamentos) a partir del índice de diferenciación Φ_{PT} mediante el programa GENALEX (Peakall & Smouse 2006). La correlación entre estas dos matrices

se evaluó mediante una prueba de Mantel con el software IBD (Bohonak 2002).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Colectas de Germoplasma

Durante los muestreos realizados en los departamentos de Norte de Santander y Santander no se hallaron muchos cultivos de la especie, la mayoría de las colectas se hicieron en jardines o huertos caseros, donde generalmente la planta había crecido en forma espontánea. A pesar de que es una especie promisoría para el país, los campesinos de estos departamentos prefieren no cultivar la planta debido a los problemas que se han presentado en experiencias anteriores, como el rajado del fruto y desacuerdos con las empresas exportadoras, posibles compradoras de las cosechas, por lo que los pocos cultivos que quedan en la región solo son suficientes para el abastecimiento de los mercados locales.

En total se colectaron 51 individuos distribuidos en 28 accesiones, 18 accesiones en el departamento de Norte de Santander y 10 en el departamento de Santander, en una altitud entre los 1800 y 2600 m.s.n.m. Los sitios de muestreo fueron seleccionados por informaciones previas (datos de herbario y averiguaciones en la comunidad).

En el departamento de Santander solo se hallaron plantas no cultivadas, ya que los cultivos de los que se tenía conocimiento habían sido reemplazados por otros, por lo que solo se colectaron plantas a orillas de camino o creciendo en huertos o jardines o caseros. En el departamento de Norte de Santander se colectaron algunos especímenes cultivados, sin embargo la gran mayoría de las accesiones pertenecen a plantas no cultivadas.

Se observó una evidente diferencia en los tamaños de fruto entre las plantas cultivadas y no cultivadas, siendo más grandes los frutos provenientes de los

cultivos. Es importante anotar que la comunidad informó que las semillas con las que se iniciaron estos cultivos provenían del departamento de Cundinamarca lo cual sugiere flujo de material entre el centro y el nor-orientes del país.

En general, en estos departamentos la especie se conoce como uchuva o guchuva, es utilizada principalmente para la preparación de jugos siendo conocido dentro de la comunidad que es una fruta con altos valores nutricionales, en un sector del departamento de Norte de Santander se conoce como cura para el cáncer.

Las colectas realizadas en estos departamentos nos permiten suponer que la diversidad genética de la especie puede ser significativa debido a que los procesos de cultivo que se han llevado a cabo no han sido sistemáticos y la mayoría de las plantas se encuentran en estado no cultivado.

Además de las accesiones obtenidas durante las colectas, se realizó un intercambio de material con otro proyecto de la Universidad Nacional de Colombia de donde se obtuvieron 28 accesiones para el departamento de Cundinamarca y 16 accesiones para el departamento de Boyacá, asimismo se adquirieron cuatro individuos provenientes del trabajo de investigación realizado en la Universidad Nacional de Palmira (Bonilla-Betancourt & Espinosa-Piedrahita 2003) de los departamentos de Valle (2), Nariño (1) y Cundinamarca (1), una muestra de la estación experimental de Tenerife (CIAT) y una muestra proveniente de Ecuador que aunque no posee datos completos de pasaporte se usó para fines de comparación.

Durante esta investigación se usaron 67 individuos pertenecientes a 30 accesiones (Tabla 1), los cuales fueron escogidos en base a la ubicación geográfica y a la situación de colección, obteniendo así una muestra representativa de las accesiones, como se muestra en el mapa del anexo G construido con el programa DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2006).

Tabla 1. Accesiones de uchuva no cultivada y cultivada usadas en el estudio de diversidad genética y estructura poblacional.

No. de Accesión	Situación de Colección	Departamento	Municipio	Vereda	Tipo de Hábitat	No. de individuos	Haplotipo de cpADN
06Uch0002	No Cultivada	Norte de Santander	Chitaga	Tapurcua	A orilla de Camino	3	I
06Uch0007	No Cultivada	Norte de Santander	Pamplona	Los Tanques	Orilla de Carretera	2	I
06Uch0008	Cultivada	Norte de Santander	Pamplona	El Escorial	Cultivo Comercial	5	-
06Uch0017	Plaza de Mercado	Norte de Santander	Pamplona	Plaza de Mercado	Mercado Local	1	-
06Uch0019	Cultivada	Cundinamarca	Granada	5 Km antes de Granada (Vía Bogotá - Granada)	Cultivo Comercial	3	I
06Uch0023	Cultivada	Cundinamarca	Silvania	Agua Bonita Central	Cultivo de Pancoger	3	I
06Uch0026	No Cultivada	Cundinamarca	Bojacá	Santa Bárbara	Huerto casero	3	I
06Uch0030	No Cultivada	Cundinamarca	Tena	Santa Bárbara	Jardín casero	1	II
06Uch0033	Cultivada	Cundinamarca	Zipacón	El Chircal	Cultivo Comercial	3	I
06Uch0036	Cultivada	Cundinamarca	Cachancipá	Casa en el pueblo	Jardín casero	1	I
06Uch0040	No Cultivada	Cundinamarca	Guasca	Pastor Ospina	Orilla de la Carretera	3	I
06Uch0041	Cultivada	Cundinamarca	Guasca	San Isidro	Cultivo Comercial	3	I
06Uch0045	No Cultivada	Cundinamarca	Suesca	Quayá	Jardín de finca	3	I
06Uch0046	Cultivada	Cundinamarca	Suesca	Quayá	Huerto Casero	3	I
06Uch0048	Cultivada	Boyacá	Ventaquemada	Subatá	Cultivo Comercial	3	I
06Uch0049	No Cultivada	Boyacá	Sáchica	El espinal	Vegetación Natural	1	II
06Uch0053	Cultivada	Boyacá	Arcabuco	Monte Suárez	Cultivo Comercial	3	I
06Uch0057	No Cultivada	Boyacá	Paipa	Caños	Jardín	3	I
06Uch0059	No Cultivada	Boyacá	Firabitoba	Mombita Llano	Orilla de la carretera	4	II
06Uch0060	No Cultivada	Boyacá	Iza	San Miguel	Al lado del camino	2	II
06Uch0066	No Cultivada	Santander	Floridablanca	Km. 6 Vía Bucaramanga - Pamplona	Orilla de carretera	1	I
06Uch0070	No Cultivada	Santander	Tona	La corcova	Finca	3	I
06Uch0071	No Cultivada	Santander	Zapatoca	Zona urbana	Huerto Casero	3	II
06Uch0073	No Cultivada	Santander	Zapatoca	Zona urbana	Huerto Abandonado	1	I
UNPU016	No Cultivada	Valle	Ginebra	Juntas	Campo	1	I
UNPU056	No Cultivada	Valle	Cali	Felidia	Campo	1	I
UNPU100	No Cultivada	Cundinamarca	Silvania	Azafranal	Jardín	1	I
UNPU212	Cultivada	Nariño	Ipiales	San Juan	Huerto	1	I
Tenerife	-	Valle	El Cerrito	Tenerife	-	1	I
Ecuador	-	-	-	-	-	1	II

6.2. Marcadores Moleculares

6.2.1. Amplificación Cruzada de Marcadores SSR en Uchuva

Se obtuvo amplificación en uchuva para 15 de los 94 loci SSR explorados (Tabla 2), sin embargo, la amplificación de la mayoría de estos loci no fue consistente en la muestra de 67 individuos seleccionada para el estudio. Para cada locus SSR, se obtuvo amplificación exitosa para un número diferente de individuos como se muestra en la Tabla 2. En cuatro de los loci estudiados se presentaron dos alelos por locus (MIC269, SSR43, STI046 y STM3015), sin embargo en ninguna de las regiones se observaron polimorfismos entre los individuos.

Tabla 2. Temperatura de anillamiento para PCR y tamaños alélicos observados en uchuva mediante amplificación cruzada de 15 loci SSR. Para cada caso se reporta el número de individuos amplificados y la especie fuente donde los loci fueron originalmente diseñados.

Locus SSR	Tamaño bp	T° anillamiento	No. individuos	Especie fuente
MIC3	230	54°C	8	<i>P. philadelphica</i>
MIC48	240	54°C	13	<i>P. philadelphica</i>
MIC89	290	58°C	4	<i>P. philadelphica</i>
MIC98	120	61°C	67	<i>P. philadelphica</i>
MIC102	280	55°C	27	<i>P. philadelphica</i>
MIC242	110	62°C	58	<i>P. philadelphica</i>
MIC269	120-240	62°C	9	<i>P. philadelphica</i>
MIC442	200	62°C	7	<i>P. philadelphica</i>
SSR43	180-260	55°C	4	<i>Solanum lycopersicum</i>
SSR130	190	61°C	4	<i>Solanum lycopersicum</i>
SSR140	140	62°C	49	<i>Solanum lycopersicum</i>
STI 013	245	55°C	23	<i>Solanum tuberosum</i>
STI 018	240	55°C	67	<i>Solanum tuberosum</i>
STI 046	180-220	55°C	61	<i>Solanum tuberosum</i>
STM 3015	235-310	55°C	21	<i>Solanum tuberosum</i>

Se debe tener en cuenta que las probabilidades de hallar polimorfismos mediante amplificación cruzada puede resultar baja tanto a nivel intragenérico

como intergenérico (Gutierrez *et al.* 2005), pues aunque los microsatélites son hipervariables dentro de la especie, al hacer la transferencia a otras especies se está identificando una región conservada, lo cual reduce las probabilidades de hallar polimorfismos. En las amplificaciones de estas regiones microsatélites se observa una falta de consistencia al ampliar el estudio a los 67 individuos, si bien, en dos regiones (STI018 y MIC 98) se logró la amplificación de todos los individuos, en las restantes no se obtuvo el mismo resultado. La ausencia de fragmentos amplificados puede obedecer algunas veces a la presencia de alelos nulos, que puede ser atribuida a mutaciones en las secuencias donde se alinean los cebadores, tal como se ha encontrado en comparaciones de SSR realizadas entre la canola y otras especies cercanamente relacionadas (Uzonova & Ecke 1999). La alta frecuencia de los alelos nulos es una consecuencia del hecho de que los SSR estudiados hayan sido desarrollados en otras especies. A pesar de estas dificultades, este tipo de estudios se continúan realizando en respuesta al alto costo y al tiempo que conlleva el diseño de estos marcadores especie-específicos.

En la imagen 4 que aparece a continuación se observa un gel de poliacrilamida con tinción en plata en el que se muestran algunos amplificados correspondientes a la región MIC242, con un marcador de peso molecular (MW) de 50 bp.

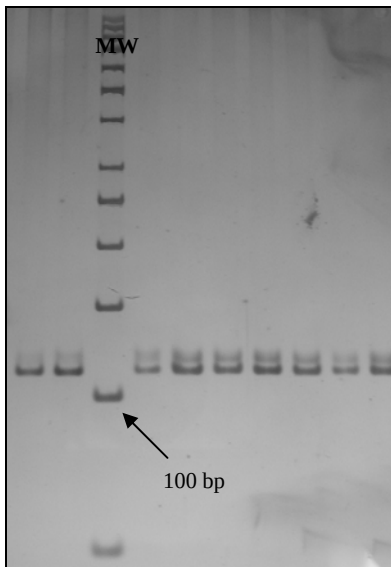


Imagen 4. Gel de poliacrilamida en el que se muestran amplificados de individuos de *P. peruviana* en el locus MIC242, junto a un marcador de peso molecular (MW) de 50 bp.

Todos los cebadores que fueron diseñados para amplificar loci SSR en el mismo género, es decir, en *P. philadelphica*, se lograron transferir a uchuva. Por el contrario, solo el 11% de los cebadores (7 de 63) diseñados para *Solanum* se transfirieron a uchuva mientras que ninguno de los cebadores provenientes de *Capsicum* se lograron amplificar. La tasa de transferencia de los SSRs a nivel intergenérico disminuye con respecto a la tasa de transferencia a nivel intragenérico (Peakall *et al.* 1998).

El bajo éxito obtenido de la amplificación cruzada de los SSR diseñados en otros géneros (*Solanum* y *Capsicum*) se puede explicar a la luz de las relaciones filogenéticas, ya que estos géneros poseen una considerable distancia filogenética con respecto a *Physalis*, lo que implica una baja tasa de transferencia, explicada por la especificidad de este tipo de marcadores, tendencia ya observada en las plantas de esta familia (Milbourne *et al.* 1998).

La mayor parte de los marcadores del género *Capsicum*, usados en el estudio, fueron diseñados a partir de ESTs (Expressed Sequence Tags) (Sanwen *et al.* 2000; Yi *et al.* 2006; Portis *et al.* 2007), por lo que se esperaba una tasa de transferencia más alta, debido a la alta conservación presente en las regiones codificantes, con respecto a las no codificantes, sin embargo, se debe recordar que la distancia filogenética existente entre los géneros *Capsicum* y *Physalis*.

En resumen, los SSR probados en este estudio no fueron informativos, para dar cumplimiento a los objetivos planteados fue necesario explorar otro tipo de marcadores que fueran hipervariables y económicos, es por esto que se recurrió a la amplificación de los marcadores ISSR.

6.2.2. Amplificación de Marcadores ISSR en Uchuva

De las 13 regiones ISSR exploradas, se logró amplificación en 7, sin embargo solo se tuvieron en cuenta 5 de estas regiones (813, 814, 824, 835 y 845) las cuales se lograron amplificar consistentemente en los 67 individuos bajo

estudio. Entre las 5 regiones analizadas se obtuvieron 24 loci, de los cuales 22 resultaron polimórficos (P=83.33%).

Inicialmente se escogió una muestra de 8 individuos en los que se amplificó cada región tres veces, las bandas que resultaron consistentes en estos ensayos fueron las que se evaluaron para el total de los 67 individuos. En la Tabla 3 se presenta un resumen de las regiones exploradas, las regiones que amplificaron y las regiones tenidas en cuenta para el análisis en la muestra de 67 individuos, con el número de loci presentes para cada región y el número de loci polimórficos.

Tabla 3. Regiones ISSR exploradas, mostrando los loci hallados.

Región	Secuencia cebador	Loci totales	Loci polimórficos
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	-	-
813 ^{1,2}	CTC TCT CTC TCT CTC TT	4	2
814 ^{1,2}	CTC TCT CTC TCT CTC TA	5	5
819 ¹	GTG TGT GTG TGT GTG TA	8	7
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	-	-
824 ^{1,2}	TCT CTC TCT CTC TCT CG	5	4
835 ^{1,2}	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	5	4
837	TAT ATA TAT ATA TAT ART	-	-
838	TAT ATA TAT ATA TAT ARC	-	-
839	TAT ATA TAT ATA TAT ARG	-	-
843 ¹	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	6	6
845 ^{1,2}	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	5	5
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	-	-
Total		38	33

¹Regiones que presentaron amplificación en uchuva, ²Regiones tomadas en cuenta para el análisis de la muestra de 67 individuos.

6.2.3. Amplificación de las Regiones del ADN del cloroplasto

De las once regiones del ADN del cloroplasto se lograron secuenciar nueve. En la Tabla 4 se observan los tamaños en pares de bases amplificados en *P. peruviana*. Sin embargo, solo tres de estas regiones (*rps14 – psaB*, *trnL* intron y *trnS – trnG*) mostraron amplificación consistente y se seleccionaron para su

análisis en un individuo de cada una de las 30 accesiones seleccionadas para el estudio.

Tabla 4. Regiones del ADN del cloroplasto con las condiciones de la reacción PCR y el tamaño en pares de bases (bp) obtenido para *Physalis peruviana*.

Región	Tamaño (bp)	[MgCl ₂]	T° anillamiento
<i>atpB</i> - <i>rbcL</i>	950	1.5mM	50°C
<i>rps14</i> - <i>psaB</i>	570	1.5 mM	50.5°C
<i>petA</i> - <i>psbE</i>	1600	1.5 mM	50.5°C
<i>psbC</i> - tRNA ^{ser}	1510	1.5 mM	50.5°C
TRNA ^{ser} – tRNA ^{fmet}	-	2.5 mM	50°C
<i>trnT</i> - <i>trnL</i>	-	2.5 mM	50°C
<i>trnL</i> intron	560	2 mM	52°C
<i>trnL</i> - <i>trnF</i>	750	1.5 mM	50°C
<i>rpl16</i> intron	1000	1.5 mM	52°C
<i>accD</i> – <i>psaI</i>	600	2.5 mM	50°C
<i>trnS</i> – <i>trnG</i>	650	2 mM	52.5°C

Las secuencias del ADN del cloroplasto fueron editadas y entre las tres regiones se obtuvieron un total de 1500 bp para el análisis, distribuidas de la siguiente manera: 465bp para la región *rps14* – *psaB*, 466bp para la región *trnL* intron y 569bp para la región *trnS* – *trnG*. Las tres regiones se lograron amplificar en un total de 26 accesiones de las 30 seleccionadas.

En la región *rps14* – *psaB* se presentó una sustitución tipo transición T/C en la posición 44, en el *trnL* intrón se presentó un INDEL de 5 nucleótidos (ATTCA) en la posición 316-320 y en la región *trnS* – *trnG* se presentó una sustitución tipo transversión (A/T) en la posición 468 (Imagen 5).

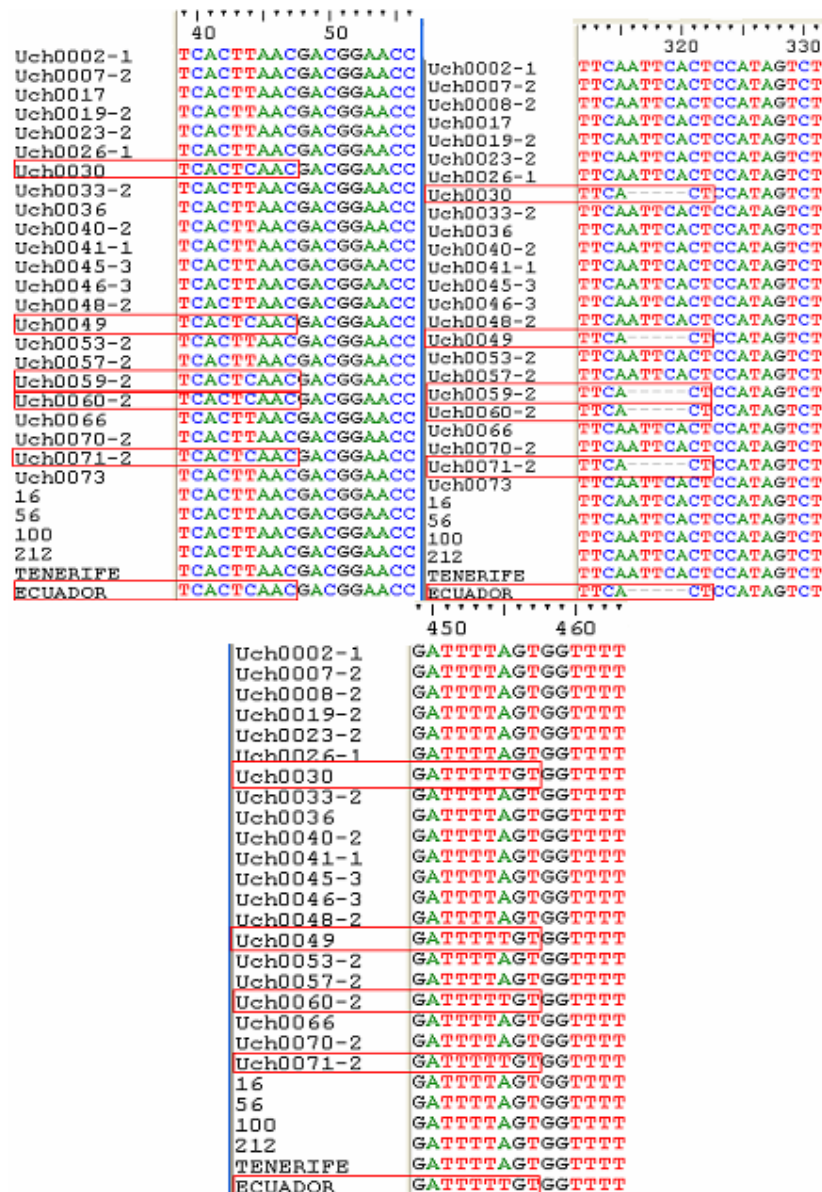


Imagen 5. Alineamientos de las secuencias donde se muestran los polimorfismos hallados para cada región. En la parte superior izquierda se muestra la región *rps14* – *psaB*, en la parte superior derecha la región *trnL* intron y en la parte inferior la región *trnS* – *trnG*, en cada región se señalan los individuos que presentan el haplotipo II (menos predominante) y se encierra en color rojo el sitio en el que se presenta el polimorfismo.

Estos tres polimorfismos permitieron la identificación de 2 haplotipos del cloroplasto denominados Haplotipo I y Haplotipo II. El más predominante es el Haplotipo I el cual está presente en 21 de las 26 accesiones (9 cultivadas y 12 no cultivadas) y el menos predominante es el Haplotipo II, presente en 5 accesiones, todas no cultivadas (Tabla 1).

Es importante anotar que las accesiones cultivadas presentaron un solo haplotipo (Haplotipo I), mientras que para las no cultivadas se presentaron los dos haplotipos, revelando una diversidad mayor dentro de este estado biológico.

6.3. Análisis de Datos

6.3.1. Diversidad Genética de *Physalis peruviana*

La diversidad genética haplotípica y nucleotídica, en las tres regiones del cloroplasto en términos de haplotipos fue de 0.323 ± 0.097 y en términos nucleotídicos fue de 0.0015 ± 0.00045 (datos mostrados en la Tabla 5).

En los marcadores ISSR la diversidad se cuantificó asumiendo EHW mediante el índice de Shannon (I) y la aproximación Bayesiana (H_B) obteniendo valores muy similares (0.459 ± 0.049 y 0.464 ± 0.022 , respectivamente). El índice (H_B) fue calculado para eliminar el sesgo que puede aparecer en los resultados al asumir EHW, sin embargo, la similaridad de los índices I y H_B brindan una mayor confiabilidad en los estadísticos obtenidos. En la Tabla 5 se observa un resumen de los índices calculados en cada marcador molecular y para las diferentes poblaciones conformadas.

Tabla 5. Índices de diversidad genética para el genoma del cloroplasto y los marcadores ISSR para cada una de las tres agrupaciones evaluadas.

Grupos	cpADN					ISSR			
Estatus Biológico	<i>N</i>	<i>h</i>	<i>S</i>	<i>Hd</i>	<i>Pi</i>	<i>N</i>	<i>P (%)</i>	<i>I</i>	<i>H_B</i>
Cultivado	9	1	0	0	0	29	79.17	0.442± 0.053	0.462± 0.02
No Cultivado	15	2	7	0.419	0.00196	36	70.83	0.408± 0.058	0.460± 0.021
<i>Total</i>	24	2	7	0.209	0.00098	65	75.00 ±4.17	0.425± 0.039	0.462± 0.019
Regiones									
Oriente	5	2	7	0.4	0.00187	19	45.83	0.235± 0.059	0.473± 0.015
Centro	16	2	7	0.325	0.00152	43	83.33	0.473± 0.050	0.464± 0.021
Sur	4	1	0	0	0	4	25	0.153± 0.057	0.422± 0.033
<i>Total</i>	25	2	7	0.242	0.00113	66	51.39 ±17.1	0.287± 0.035	0.454± 0.018
Departamentos									
Norte de Santander	2	1	0	0	0	11	41.67	0.206± 0.057	0.482± 0.011
Cundinamarca	11	2	7	0.182	0.00085	27	75.00	0.428± 0.056	0.476± 0.013
Boyacá	5	2	7	0.6	0.00280	16	58.33	0.357± 0.065	0.435± 0.025
Santander	3	2	7	0.667	0.00311	8	29.17	0.145± 0.049	0.457± 0.021
Valle	3	1	0	0	0	3	20.83	0.125± 0.052	0.411± 0.049
<i>Total</i>	24	2	7	0.29	0.001352	65	45.00 ±9.81	0.252± 0.027	0.462± 0.013
Total	26	2	7	0.323± 0.097	0.0015± 0.00045	67	83.33	0.459± 0.049	0.464± 0.022

N = Número de individuos; *h* = Número de haplotipos; *S* = Número de sitios segregantes; *Hd* = Diversidad haplotípica; *Pi* = Diversidad nucleotídica; *P* = Porcentaje de loci polimórficos; *I* = Índice de Shannon; *H_B* = Diversidad con aproximación bayesiana.

En el grupo de datos obtenidos para el cpADN se presenta únicamente el haplotipo I para los grupos de los individuos cultivados, de Norte de Santander, de Valle y de la región Sur. En general la diversidad del cpADN es muy baja para todas las agrupaciones, así como para el total de los individuos. La escasa cantidad de haplotipos hallados y la ausencia de diversidad en algunos de los grupos conformados hacen que la cuantificación de la reducción de la diversidad genética de los tipos cultivados con respecto a los tipos no cultivados no sea informativa, ya que al aplicar la fórmula obtendríamos una reducción del 100% en diversidad lo que sería un artefacto de la baja diversidad encontrada en estas regiones del genoma.

En los datos obtenidos para los ISSR se observan niveles relativamente altos de diversidad genética en la muestra total sustentados por un $I = 0.459$ y $H_B = 0.464$. Sin embargo, al observar la diversidad dentro de los grupos o poblaciones se observa una disminución drástica en I (excepto para el grupo de estatus biológico) mientras que el valor de H_B se mantiene constante tanto en los grupos como en los subgrupos. Se observa una aparente correlación entre el tamaño de la muestra y el valor de I , es decir, los subgrupos con un tamaño mayor de muestra presentan también un mayor índice de diversidad genética. Sin embargo, esta correlación no es aparente cuando se mide la diversidad genética con el índice H_B . Estas diferencias en los valores se deben a la manera de realizar los cálculos para cada índice (I y H_B), los modelos clásicos estadísticos, como el que se usa para calcular el índice de Shannon, son dependientes del método de muestreo, por el contrario, en la estadística bayesiana (H_B) el método de muestreo no es importante, solo los datos son tenidos en cuenta, esta característica se debe tener muy presente, ya que el índice de Shannon al ser dependiente del método de muestreo puede crear artefactos en los resultados, en especial en este tipo de estudios donde la metodología para realizar los muestreos aún no ha sido estandarizada.

Existe un alto contraste entre los datos de diversidad genética obtenidos de las dos fuentes disponibles (ISSR y $_{CP}ADN$) que pueden ser en parte explicados por las altas tasas de mutación de las regiones microsatélites del genoma nuclear con respecto al genoma del cloroplasto (Morgante & Olivieri 1993), ya que las regiones expuestas a tasas de mutación mayores tienen una probabilidad más alta de presentar polimorfismos por lo que la diversidad genética tendría una tendencia al aumento; y por el modo de transmisión, uniparental en el caso del cloroplasto y biparental en el caso de los ISSR. Cabe recordar que la herencia biparental favorece la recombinación genética, la cual crea nuevas combinaciones alélicas en especies alógamas con un porcentaje más alto de individuos heterocigotos que se reflejan en el aumento de la diversidad genética. Aunque estas hipótesis pueden soportar el contraste entre la alta diversidad genética encontrada en los marcadores ISSR y la baja diversidad en los marcadores de $_{CP}ADN$, debemos recordar que las regiones

exploradas dentro del genoma del cloroplasto constituyen una parte muy pequeña de él por lo que estos resultados podrían ser artefactos de la poca cantidad de pares de bases analizadas (1500 bp) con respecto al genoma total del cloroplasto (de 120 a 220 kb) (Palmer, 1987).

6.3.1.1. Efecto de las actividades de cultivo sobre la diversidad genética en la uchuva

La reducción de la diversidad genética de los tipos cultivados con respecto a los no cultivados, medida por medio de los marcadores ISSR, es negativa para los índices de diversidad ($I = -8.33\%$ y $H_B = -0.43\%$), es decir, no existe una reducción de la diversidad genética dentro de los individuos cultivados, lo que indica claramente que los procesos de selección que han sido llevados a cabo por el hombre, hasta el momento, no han afectado aparentemente la diversidad genética de la especie.

Para evaluar el efecto que las actividades humanas pueden haber tenido sobre la diversidad genética en la uchuva, se realizaron análisis adicionales como se muestra en la Tabla 6. En estos análisis se tuvieron en cuenta factores de tipo ambiental, por ejemplo por tipo de hábitat y por altitud.

Tabla 6. Índices de diversidad genética para los marcadores ISSR en cada una de los grupos conformados según la altitud y el tipo de hábitat.

Grupos	ISSR			
Altitud	<i>N</i>	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	H_B
<2000 m.s.n.m.	12	41.67	0.218±0.058	0.467±0.016
2000-2200 m.s.n.m.	3	29.17	0.190±0.062	0.431±0.039
2200-2400 m.s.n.m.	7	33.33	0.189±0.059	0.438±0.026
2400-2600 m.s.n.m.	23	66.67	0.397±0.061	0.460±0.019
>2600 m.s.n.m.	19	70.83	0.420±0.058	0.471±0.015
Total	64	48.33±8.6	0.283±0.028	0.463±0.014
Hábitat				
Orillas de camino	18	66.67	0.388±0.060	0.467±0.017
Huertas y Jardines	18	62.50	0.372±0.063	0.457±0.020
Cultivos Comerciales	23	70.83	0.400±0.059	0.461±0.019
Plazas de Mercado	6	45.83	0.281±0.066	0.445±0.025
Total	65	61.46±5.48	0.360±0.031	0.462±0.0147

N = Número de individuos; *P* = Porcentaje de loci polimórficos; *I* = Índice de Shannon; H_B = Diversidad con aproximación bayesiana.

Para estas agrupaciones se encontraron unos niveles de diversidad genética similares a los ya mostrados. En estos índices se aprecia nuevamente una aparente correlación entre el tamaño de muestra (N) y el índice de Shannon (I), sin embargo, los diferentes grupos conformados presentan una alta diversidad medida por el estadístico H_B con valores similares en todas las agrupaciones. Estos resultados son muy similares a los ya presentados, indicando que al conformar poblaciones con diferentes criterios, como hábitat y altitud, la diversidad genética no se ve alterada, reafirmando de esta forma los altos niveles de diversidad relativos de la especie encontrados en este estudio.

6.3.1.2. Diversidad Genética Asociada al Origen Geográfico

Para los datos obtenidos a partir de los marcadores ISSR, la diversidad genética entre los departamentos y las regiones se comportó de la misma manera que en las demás agrupaciones, es decir, una diversidad genética relativamente alta medida con el estadístico H_B a través de todos los departamentos y regiones geográficas (Tabla 5), mientras que el estadístico I parece estar relacionado con el tamaño de muestra.

Se midió la diversidad genética entre la uchuva no cultivada y la cultivada, y entre los diferentes tipos de hábitat dentro de departamentos y regiones geográficas para evaluar con mayor detalle si existe alguna reducción en diversidad genética al interior de las regiones geográficas. En la tabla 7 se muestran los diferentes departamentos y regiones con las respectivas agrupaciones realizadas para cada uno, reportando los índices I y H_B , el porcentaje de loci polimórficos (P) y el número de muestra (N).

Tabla 7. Índices de diversidad genética para los marcadores ISSR en cada uno de los grupos conformados dentro de los departamentos y las regiones.

Grupos	ISSR			
Oriente	<i>N</i>	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	<i>H_B</i>
Cultivado	6	25.00	0.132±0.051	0.453±0.023
No Cultivado	13	41.67	0.216±0.058	0.479±0.012
Total	19	33.33±8.33	0.174±0.039	0.462±0.017
Orilla de Camino	6	41.67	0.195±0.054	0.464±0.019
Huertas y Jardines	7	25.00	0.131±0.049	0.467±0.018
Cultivo Comercial	5	16.67	0.106±0.050	0.454±0.023
Total	18	27.78±7.35	0.144±0.029	0.443±0.017
Centro				
Cultivado	22	79.17	0.445±0.053	0.471±0.016
No Cultivado	21	70.83	0.428±0.061	0.460±0.019
Total	43	75.00±4.17	0.437±0.040	0.469±0.015
Orilla de Camino	10	66.67	0.413±0.063	0.449±0.022
Huertas y Jardines	11	58.33	0.371±0.066	0.452±0.021
Cultivo Comercial	18	66.67	0.384±0.061	0.463±0.018
Plazas de mercado	4	41.67	0.262±0.066	0.440±0.028
Total	43	58.33±5.89	0.357±0.032	0.461±0.014
Norte de Santander				
Cultivado	6	25.00	0.132±0.051	0.454±0.022
No Cultivado	5	20.83	0.136±0.055	0.455±0.022
Total	11	22.92±2.08	0.134±0.037	0.451±0.019
Cundinamarca				
Cultivado	16	70.83	0.396±0.058	0.469±0.015
No Cultivado	11	62.50	0.382±0.064	0.469±0.016
Total	27	66.67±4.17	0.389±0.043	0.474±0.012
Orilla de Camino	3	37.50	0.235±0.064	0.439±0.031
Huertas y Jardines	8	54.17	0.323±0.064	0.471±0.017
Cultivo Comercial	12	54.17	0.317±0.063	0.464±0.017
Plazas de mercado	4	41.67	0.262±0.066	0.440±0.028
Total	27	46.88±4.29	0.284±0.032	0.454±0.016
Boyacá				
Cultivado	6	33.33	0.198±0.061	0.453±0.025
No Cultivado	10	50.00	0.309±0.066	0.436±0.025
Total	16	41.67±8.33	0.254±0.045	0.422±0.024
Orilla de Camino	7	50.00	0.307±0.065	0.443±0.025
Huertas y Jardines	3	25.00	0.153±0.056	0.451±0.027
Cultivo Comercial	6	33.33	0.198±0.061	0.451±0.025
Total	16	36.11±7.35	0.220±0.035	0.431±0.021

N = Número de individuos; *P* = Porcentaje de loci polimórficos; *I* = Índice de Shannon; *H_B* = Diversidad con aproximación bayesiana.

El departamento de Valle no se tuvo en cuenta en estos análisis debido al tamaño reducido de la muestra, y el departamento de Santander tampoco fue tenido en cuenta ya que todas las accesiones colectadas allí son de tipo no cultivado; para el departamento de Norte de Santander no se realizaron los análisis según el tipo de hábitat, ya que no resultaba informativo, debido a que

las accesiones se agrupaban de la misma forma que según el tipo cultivado Vs no cultivado y los dos tipos de hábitat en este departamento (Orilla de camino y Cultivo Comercial).

Los resultados obtenidos en esta sección nos sugieren una diversidad relativamente alta en la población de uchuva estudiada sin importar el origen geográfico, estatus biológico, hábitat o altitud. En esta especie solo se ha reportado un estudio de diversidad genética realizado con marcadores RAPD (Bonilla-Betancourt & Espinosa-Piedrahita 2003) en el que se halló también una diversidad genética relativamente alta, medida por la heterocigosidad ($H=0.2559$). Estos resultados se pueden asociar a la probable naturaleza alógama de la planta (Lagos, 2006) que permite la conservación de una alta heterocigosidad en las poblaciones.

6.3.2. Estructura Poblacional

6.3.2.1. Estructura Poblacional entre la Uchuva Cultivada y la Uchuva No Cultivada

Con el propósito de buscar evidencias sobre la posible existencia de diferencias genéticas entre las poblaciones cultivadas y no cultivadas, se realizaron análisis de diferenciación para cada uno de los grupos. Se tuvo en cuenta el índice de diferenciación Φ_{PT} para marcadores ISSR y cpADN, expresado como la varianza entre grupos con respecto a la varianza total. Para los datos obtenidos del genoma del cloroplasto, también se presenta el índice G_{ST} que es un indicador de la diversidad distribuida entre las poblaciones y el índice N_{ST} que estima el nivel de diferenciación entre secuencias de nucleótidos entre las poblaciones. El N_m calcula el flujo génico entre las poblaciones. En la tabla 8 se presenta un resumen de los índices obtenidos.

Tabla 8. Índices de estructura poblacional entre las poblaciones de uchuva cultivada y Uchuva no cultivada.

Configuración de Grupos		c_pADN	ISSR
Cultivado Vs No Cultivado	Fuente de Variación		
	Dentro de grupos	85%	97%
	Entre los Grupos	15%	3%
	Índices de Fijación		
	Φ_{PT}	0.151 ^{NS}	0.029 [*]
	N_m	2.813	N.A.
	G_{ST}	0.095	N.A.
	N_m	2.38	N.A.
	N_{ST}	0.214	N.A.
	N_m	0.92	N.A.

^{NS} No significativo, ^{*} $P < 0.05$.

En los datos obtenidos del genoma del cloroplasto, las poblaciones presentan una baja estructura poblacional definida por un valor de $\Phi_{PT}=0.151$ que es relativamente pequeño y además no es significativo.

Los índices G_{ST} y N_{ST} son pequeños (0.095 y 0.214 respectivamente), lo que nos está mostrando una baja diferenciación entre los tipos no cultivados y cultivados y una mayor parte de la diversidad genética distribuida dentro de los grupos. Esto podría deberse a un alto flujo génico (N_m) entre las poblaciones, como se puede ver en los valores de la Tabla 8.

En los resultados obtenidos para los marcadores ISSR también se observa una baja estructura poblacional expresada con el estadístico Φ_{PT} , el cual presenta un valor muy bajo (0.029) aunque significativo.

Se realizó una exploración en busca de posibles grupos basados en el cálculo de distancias genéticas y en la aplicación de métodos de agrupamiento. En las imágenes que se muestran a continuación (6-9) se muestran las topologías correspondientes a la distancia genética de Nei (Nei 1978) y a la distancia geométrica euclidiana, agrupadas con los métodos UPGMA y NJ, en cada topología se muestran los valores de bootstrap.

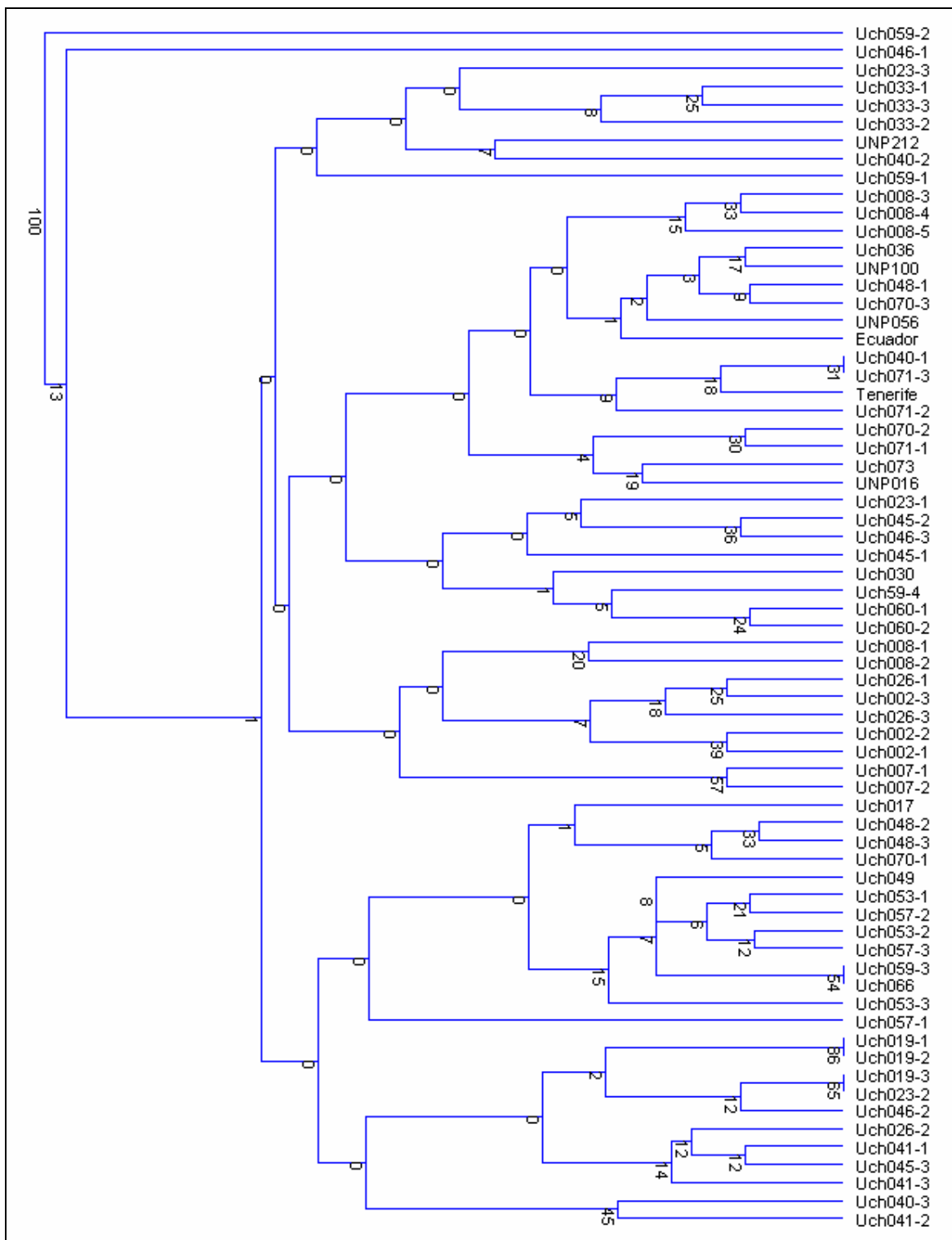


Imagen 6. Topología correspondiente a la distancia genética de Nei (Nei 1978) y a la agrupación UPGMA, en cada nodo se encuentra señalado el valor bootstrap.

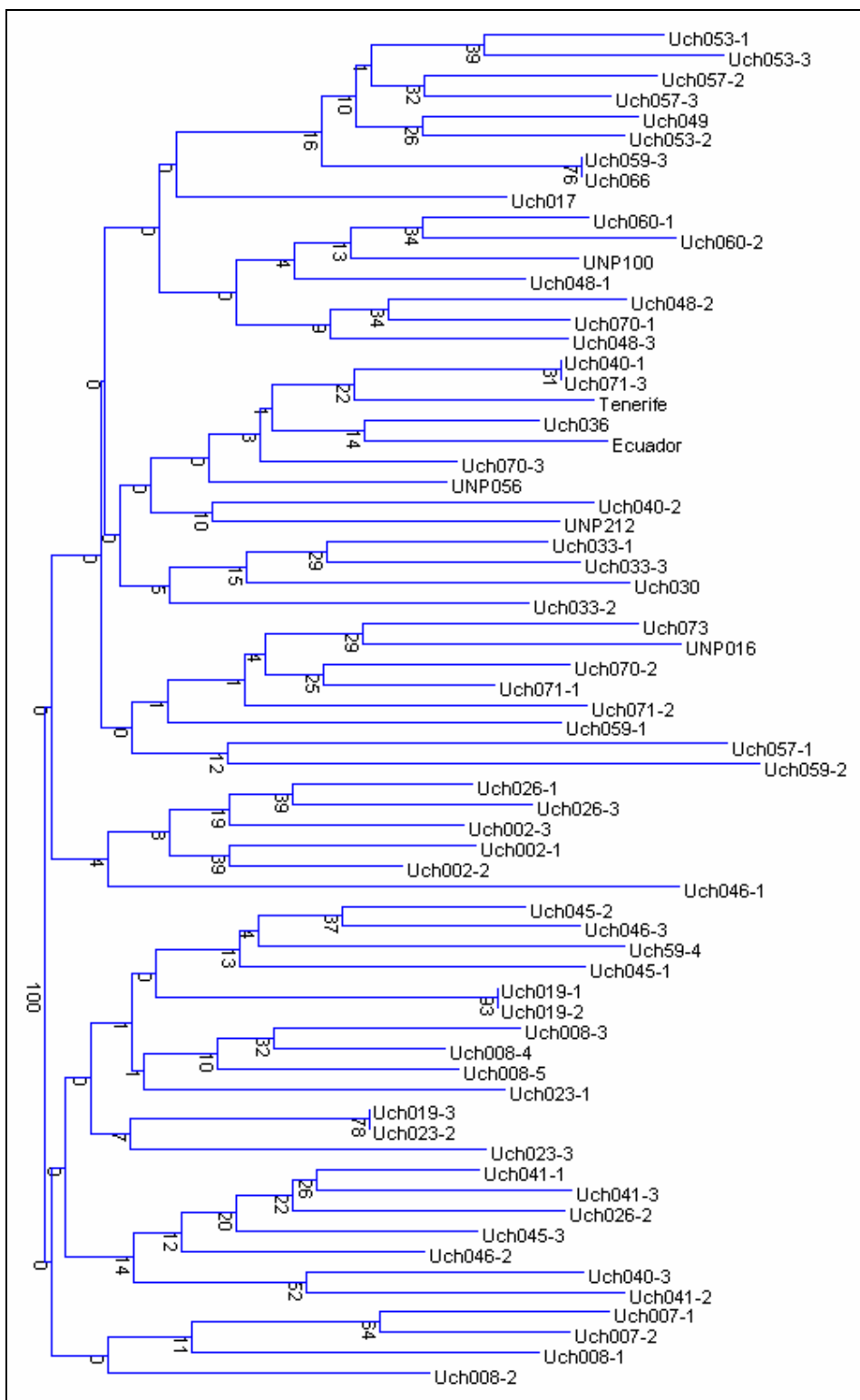


Imagen 8. Topología correspondiente a la distancia euclidiana y a la agrupación NJ, en cada nodo se encuentra señalado el valor bootstrap.

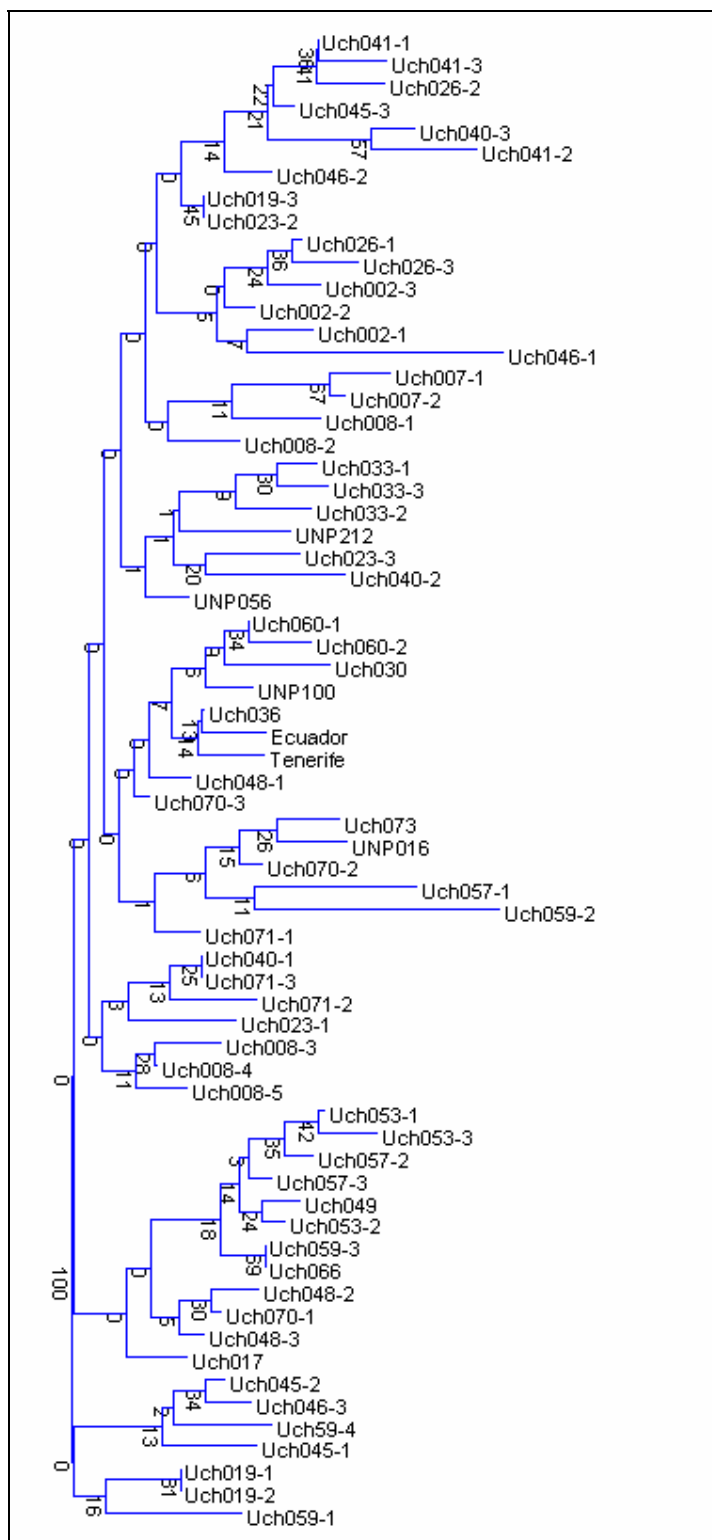


Imagen 9. Topología correspondiente a la distancia genética de Nei (Nei 1978) y a la agrupación NJ, en cada nodo se encuentra señalado el valor bootstrap.

Los dendrogramas contruidos mediante la distancia genética de Nei (Nei 1978) no conforman grupos discretos, ni siquiera para los individuos pertenecientes a la misma accesión, solo un nodo se encuentra bien soportado por bootstrap en las 4 topologías mostradas, el nodo está conformado por los individuos Uch0019-1 y Uch0019-2, donde, los valores de bootstrap para cada topología son mayores al 80%.

Los análisis AMOVA y los análisis de agrupamiento muestran congruencia para los dos tipos de marcadores estudiados ($_{CP}ADN$ e ISSR), es decir no hay una estructura poblacional evidente entre los tipos cultivado y no cultivado. Estos resultados sugieren que los procesos de cultivo llevados a cabo en esta especie no han interrumpido el flujo génico entre los dos tipos, por lo tanto las actividades del hombre aún no han logrado un aislamiento genético entre ellos.

En los resultados basados en el $_{CP}ADN$ se registraron 2 haplotipos, haplotipo I y II, siendo el haplotipo I el más frecuente. La uchuva no cultivada presenta ambos haplotipos, mientras que la uchuva cultivada solo posee el haplotipo I. Es muy difícil concluir sobre el origen de la uchuva cultivada sobre la base de estos resultados, ya que no se puede establecer cuál haplotipo es el ancestral. Por lo tanto, por el momento se plantean las siguientes dos hipótesis. Primero, que las plantas no cultivadas son “escapes” de las plantas de tipo cultivado en las cuales se originó por mutación el haplotipo II. Segundo, que las plantas cultivadas se derivaron de plantas no cultivadas portadoras del haplotipo I.

6.3.2.2. Estructura Geográfica Poblacional

Con el propósito de buscar evidencias sobre la posible existencia de diferencias genéticas relacionadas con el origen geográfico se conformaron grupos por departamentos y por regiones, en estas poblaciones se realizaron análisis de diferenciación para cada una, se tuvo en cuenta el índice de diferenciación Φ_{PT} para los datos ISSR y $_{cp}ADN$, el cual fue calculado vía AMOVA; para los datos obtenidos del genoma del cloroplasto, también se presenta el índice G_{ST} que es un indicador de la diversidad distribuida entre las poblaciones y el índice N_{ST} que estima el nivel de diferenciación entre

secuencias de nucleótidos entre poblaciones; para cada uno de estos índices se presenta el flujo génico (N_m), en la Tabla 9 se presentan los resultados.

Tabla 9. Índices de Estructura Poblacional entre las poblaciones de Uchuva conformadas según el origen geográfico.

Configuración de Grupos		c_{pADN}	ISSR
Regiones	Fuente de Variación		
	Dentro del grupo	100%	85%
	Entre los Grupos	0%	15%
	Índices de Fijación		
	Φ_{PT}	0	0.147*
	N_m	∞	N.A.
	G_{ST}	0	N.A.
	N_m	∞	N.A.
	N_{ST}	0	N.A.
	N_m	∞	N.A.
Departamentos	Fuente de Variación		
	Dentro del grupo	100%	77%
	Entre los Grupos	0%	23%
	Índices de Fijación		
	Φ_{PT}	0	0.229*
	N_m	∞	N.A.
	G_{ST}	0.011	N.A.
	N_m	23.40	N.A.
	N_{ST}	0	N.A.
	N_m	∞	N.A.

* $P < 0.005$.

Los resultados obtenidos del genoma del cloroplasto muestran una estructura poblacional de cero para las dos poblaciones y todos los índices, excepto el índice G_{ST} en la población conformada por departamentos que presenta un valor de 0.011, el cual es muy cercano a cero, por lo que podemos afirmar que no existe estructura poblacional en ninguna de las dos conformaciones (Departamentos y Regiones).

En el caso de los resultados obtenidos a partir de los ISSR, se presenta una baja estructura poblacional en las dos conformaciones, sustentada por valores Φ_{PT} de 0.147 y 0.242, que aunque son pequeños son significativos.

La correlación realizada entre la matriz de distancias geográficas y la matriz de distancias genéticas (Tabla 12) mediante la prueba de Mantel no es significativa ($r = -0.4234$; $P < 0.05$), este dato evidencia, nuevamente, que los individuos de este estudio presentan una estructura poblacional muy pequeña, con respecto al origen geográfico.

Los haplotipos obtenidos a partir del genoma del cloroplasto se ubicaron en un mapa mostrado en la imagen 10, donde se puede observar de una forma gráfica la falta de asociación entre los haplotipos y el origen geográfico de las accesiones, en la tabla 10 que se presenta a continuación se muestra la distribución de los haplotipos por departamento y según su estatus biológico.

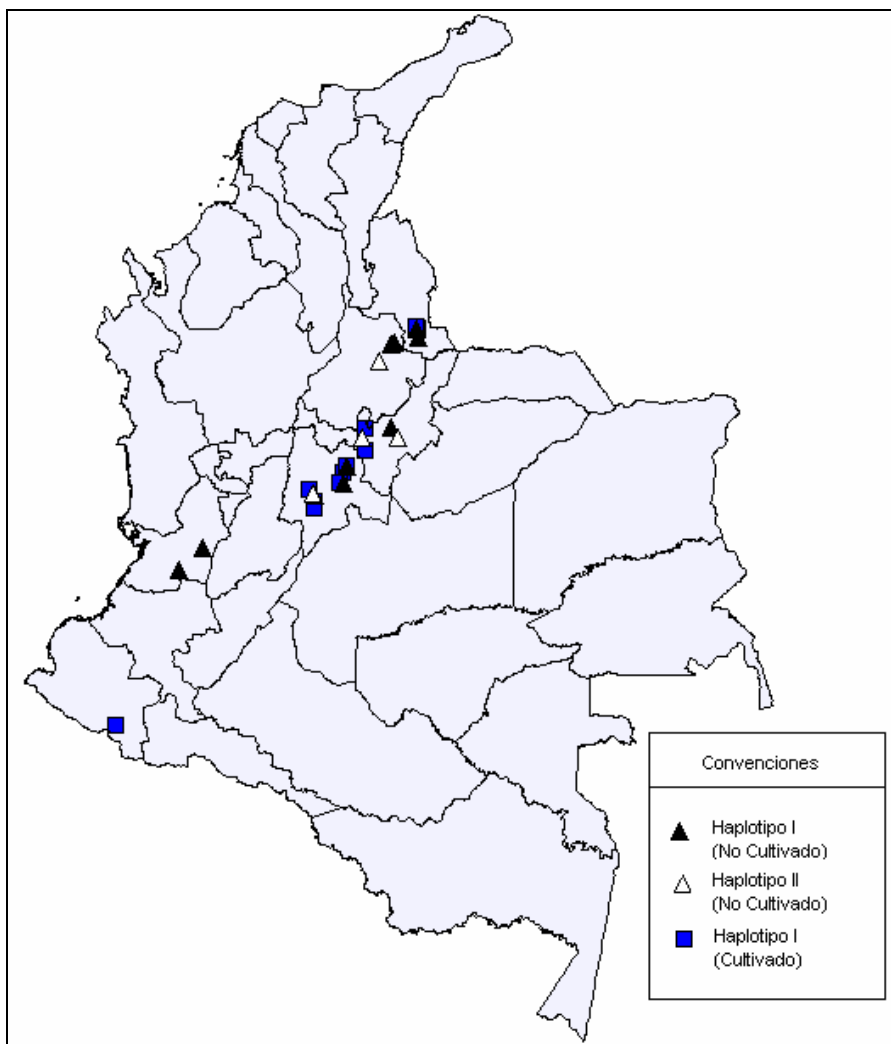


Imagen 10. Mapa de Colombia en el que se muestra la distribución de los haplotipos del genoma del cloroplasto hallados en este estudio.

Tabla 10. Distribución de los haplotipos de cpADN por departamento y según el estatus biológico.

Departamento	Haplotipo				
	Haplotipo I			Haplotipo II	
	No Cultivado	Cultivado	Desconocido	No Cultivado	Desconocido
Norte de Santander	2	0	0	0	0
Santander	3	0	0	1	0
Boyacá	1	1	0	3	0
Cundinamarca	4	6	0	1	0
Valle	1	0	1	0	0
Nariño	0	1	0	0	0
Ecuador	0	0	0	0	1
Total	11	8	1	5	1

El haplotipo I se encuentra ampliamente distribuido, mientras que el haplotipo II parece estar restringido al centro del país. Sin embargo el hecho de encontrar que la accesión perteneciente a Ecuador presenta el haplotipo II nos indica que este haplotipo podría tener también una amplia distribución en el suroccidente del país, lo cual necesita verificarse con futuros estudios.

Los datos obtenidos mediante los ISSR fueron explorados a nivel intra-departamental, para observar si existen niveles de estructura poblacional dentro de los departamentos entre los tipos cultivado y no cultivado. El departamento de Valle no se tuvo en cuenta por el bajo tamaño poblacional, el departamento de Santander tampoco se tuvo en cuenta ya que todas las accesiones del estudio que pertenecen a este departamento son de tipo no cultivado. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para el índice Φ_{PT} .

Tabla 11. Índices de Estructura Poblacional entre las poblaciones de Uchuva cultivada y no cultivada a nivel intradepartamental.

Configuración de Grupos		ISSR
Norte de Santander	Fuente de Variación	
	Dentro del grupo	69%
	Entre los Grupos	31%
	Índice de Fijación	
	Φ_{PT}	0.306 [*]
Cundinamarca	Fuente de Variación	
	Dentro del grupo	100%
	Entre los Grupos	0%
	Índice de Fijación	
	Φ_{PT}	0
Boyacá	Fuente de Variación	
	Dentro del grupo	95%
	Entre los Grupos	5%
	Índice de Fijación	
	Φ_{PT}	0.053 ^{NS}

* $P < 0.005$, ^{NS} No Significativo.

El departamento de Cundinamarca no presentó estructura poblacional entre los tipos cultivados y no cultivados, el departamento de Boyacá presentó un valor Φ_{PT} de 0.053 que no es significativo y además es muy cercano a cero, sin embargo el departamento de Norte de Santander presentó una estructura poblacional considerable cuantificada en 0.306 por el estadístico Φ_{PT} .

La estructura poblacional presente dentro del departamento de Norte de Santander puede ser debida al hecho de que las plantas de tipo cultivado colectadas en el departamento provienen de semillas traídas del departamento de Cundinamarca según informaron los campesinos de la zona.

Tabla 12. Matriz de distancias geográficas en kilómetros (arriba de la diagonal) y de diferenciación genética (índice de divergencia Φ_{PT}) (debajo de la diagonal) entre pares de departamentos usadas en la prueba de Mantel de aislamiento por distancia

Norte de Santander	0	318	199	69
Cundinamarca	0.117	0	134	257
Boyacá	0.354	0.194	0	152
Santander	0.264	0.265	0.358	0
	Norte de Santander	Cundinamarca	Boyacá	Santander

El valor mas pequeño registrado entre los departamentos, fue el correspondiente a los departamentos de Norte de Santander y Cundinamarca ($\Phi_{PT}= 0.117$), confirmando el flujo génico existente entre ellos.

La estructura poblacional dentro del departamento de Norte de Santander nos habla un poco de la historia del cultivo dentro del departamento, pues es conocido que antes de que empezara a cultivarse la fruta en el departamento, ésta se podía encontrar de forma espontánea en los campos de la región. A pesar del hecho de que el material genético que ha originado los cultivos en Norte de Santander proviene de un tipo cultivado del departamento de Cundinamarca es importante resaltar que la diversidad genética de la especie, en general, presenta niveles relativamente altos, hecho muy importante para la conservación del acervo genético de la especie.

Los resultados expuestos en esta sección del trabajo nos han mostrado consistentemente una baja estructura poblacional a nivel de estado biológico y a nivel geográfico, esto evidencia un alto flujo génico entre las poblaciones. *P. peruviana* es una planta alógama, cuyas flores son polinizadas por insectos y por el viento principalmente (Lagos, 2006), lo cual facilita el flujo génico entre las poblaciones y por ende favorece la diversidad genética de la especie. Por otro lado, estudios morfo-agronómicos de la planta (Santana & Angarita 1999) han revelado una gran variabilidad fenotípica que coincide con la variabilidad genotípica encontrada en esta investigación.

La baja estructura poblacional sugiere que estas se comportan como una población única, donde los aislamientos de tipo geográfico y de tipo biológico entre los individuos no son tan marcados. Este tipo de estructura nos sugiere a nivel geográfico que la especie pudo haber tenido una expansión rápida en las zonas que fueron muestreadas en este estudio, probablemente, teniendo como vehículo dispersor la intervención humana. Sin embargo, esta intervención aún no ha tenido efectos negativos sobre la diversidad de la especie como lo revelan los niveles relativamente altos de diversidad genética descritos en la sección anterior.

6.4. Aspectos en Relación a la Semi-Domesticación

Una reducción significativa en los niveles de diversidad genética es el resultado que se espera en una especie que ha estado sometida al proceso de domesticación, esto se ha reportado en la muchas de las especies que se consideran domesticadas (Doebley, 1992), por esta razón, se esperaba que los niveles de diversidad genética en las poblaciones estudiadas de *P. peruviana* presentaran una reducción en las plantas de tipo cultivado con respecto a las plantas de tipo no cultivado. En este estudio se observaron niveles de variabilidad genética similares entre los dos estados biológicos, tal como se había reportado en *Polaskia chichipe* (Otero-Arnaíz *et al* 2005).

En la muestra estudiada no se observa reducción genética de las plantas cultivadas con respecto a las plantas no cultivadas, por el contrario la variación hallada mediante marcadores ISSR reportada para las plantas cultivadas es ligeramente mayor a la reportada para las plantas no cultivadas, este resultado puede deberse a que las plantas tomadas como no cultivadas sean escapes de los cultivos, sin embargo, dada la baja estructura poblacional hallada, se puede también afirmar que este resultado puede reflejar un alto flujo génico que puede existir entre ambos estados biológicos.

Este alto flujo génico entre las poblaciones, es característico de especies en estado de semi-domesticación, casos como éste han sido reportados en especies como *Vitellaria paradoxa* (Bouvet *et al.* 2004) y *Adansonia digitata* (Assogbadjo *et al.* 2006).

Los altos niveles de diversidad genética encontrados en *P. peruviana* pueden ser explicados, en parte, por el estatus de planta semi-domesticada en que se encuentra la especie (Bouvet *et al.* 2004; Assogbadjo *et al.* 2006), la mayor variación se concentra dentro de las poblaciones y no entre las poblaciones, esto se debe posiblemente a las actividades que llevan a cabo los agricultores, facilitando el intercambio del germoplasma al transportar los frutos de un lugar a otro.

Los datos obtenidos mediante el ADN del cloroplasto evidencian una pérdida de diversidad de las plantas cultivadas con respecto a las plantas no cultivadas, sustentada por la presencia exclusiva del haplotipo II en las plantas de tipo no cultivado. Esta reducción de la variación es una consecuencia típica del proceso de domesticación (Ladizinsky 1998). Sin embargo, los haplotipos hallados mediante el ADN del cloroplasto son muy escasos, por lo que sería necesario explorar otras regiones.

A pesar del proceso de domesticación al que esta sometido *P. peruviana* la variación genética encontrada en la población es significativa, siendo mayor a la encontrada en otras especies semi-domesticadas (Bouvet *et al.* 2004; Assogbadjo *et al.* 2006).

P. peruviana tiene una larga historia de cultivo que se remonta a los Incas (Legge 1974; Vietmeyer 1989), este proceso de domesticación se ve reflejado en variaciones a nivel morfológico, en especial, el aumento en el tamaño del fruto. Sin embargo, este estudio revela que a nivel genético las diferencias detectadas mediante marcadores de tipo neutral son muy leves. Al parecer, el alto flujo génico que existe entre las poblaciones ha contrarrestado la fuerte selección a la que ha estado sometida la especie.

La uchuva esta considerada como una planta semi-domesticada, ya que se ajusta a la definición dada por Clements en 1999. En esta definición se tiene en cuenta la variabilidad de los fenotipos entre los tipos cultivado y no cultivado, sin embargo, este estudio revela bajos niveles de diferenciación genética entre los dos estados biológicos, este resultado podría reflejar una domesticación aún incipiente. Sin embargo se debe tener en cuenta que el estudio fue realizado con marcadores de tipo neutral, por lo que el real estatus de domesticación en el que se encuentra la especie debe ser corroborado con estudios posteriores en los que se tengan en cuenta otro tipo de marcadores que brinden una visión más amplia del genoma de esta especie.

Las especies semi-domesticadas deben tener una mayor atención por parte de los investigadores, en especial, dirigida a la conservación de los recursos genéticos, ya que estos esfuerzos permitirán la utilización sostenida de diferentes plantas alimenticias, aromáticas y medicinales.

6.5. Consideraciones para la Conservación de la Diversidad Genética de la Uchuva en Colombia

En nuestro país la especie *P. peruviana* ha tomado una gran importancia en el renglón de las exportaciones, aunque es un cultivo incipiente en nuestro país, el hecho de que la uchuva colombiana sea la más apetecida en el mundo, abre un sinfín de posibilidades para la adecuada explotación de la fruta en el país, sin embargo, es de vital importancia hacer estudios en todos los aspectos para el adecuado conocimiento de la especie.

Ampliar las colecciones de germoplasma y explorar su diversidad genética es muy importante, ya que esto evita que haya problemas de escasa representatividad en los bancos de germoplasma. Para la muestra colectada en este estudio se observó una heterogeneidad genética dentro de las poblaciones, detectada por los métodos usados para medir la diversidad de las poblaciones, sin embargo, se encontró una baja diferenciación entre las poblaciones, lo que nos indica que probablemente con una muestra pequeña de las poblaciones podríamos representar una alta proporción de la diversidad

genética detectada. La conservación de estas semillas *ex-situ* es muy importante para la conservación de la variabilidad y para el desarrollo de variedades mejoradas.

Este estudio provee evidencia de los niveles relativamente altos de diversidad presente en la especie en las zonas nororiental y central de Colombia, los datos obtenidos a través de los ISSR revelaron altos niveles de diversidad dentro de las poblaciones, aunque los datos provenientes del genoma del cloroplasto no revelan la misma diversidad, esto puede estar ocasionado por la naturaleza misma de los marcadores, sin embargo los análisis realizados para explorar la estructura poblacional de los individuos presentaron una alta congruencia entre los dos marcadores utilizados, revelando una baja estructura poblacional a nivel geográfico y a nivel de estatus biológico, estos resultados evidencian un estado de domesticación bastante incipiente dentro de la especie en nuestro país.

Los estudios en esta especie se deben seguir realizando en nuestro país para poder explotar nuestros recursos genéticos de una manera segura y sostenible que permita el mejoramiento de los cultivos. Ampliar las colecciones de germoplasma y explorarlas debe ser un objetivo fundamental para los investigadores que deseen estudiar esta planta; también es muy importante implementar otro tipo de estudios a nivel molecular, como la exploración de QTLs y análisis de ligamiento genético que permitan identificar genes de interés dentro de este cultivo.

7. CONCLUSIONES

- Las plantas encontradas en los departamentos de Santander y Norte de Santander son predominantemente de tipo no cultivado, los cultivos en esta región del país han disminuido sustancialmente, por lo que, los cultivos presentes solo abastecen los mercados locales.
- La transferencia de los marcadores microsatélites diseñados en otras especies de la familia no resulta exitosa. En primer lugar el porcentaje de transferencia fue demasiado bajo y segundo no se presentaron polimorfismos, indicando que la amplificación cruzada de marcadores microsatélites es una técnica que no presenta efectividad en *Physalis peruviana* L.
- Los niveles de estructura poblacional hallados en la muestra fueron bajos, en especial para las conformaciones por estado biológico, indicando que la población estudiada se comporta como una población única, sin embargo a nivel geográfico la población se halla un poco mas estructurada, lo que revela un alto flujo génico entre las poblaciones dentro de los departamentos, mas no, entre los departamentos. Este patrón muestra una rápida expansión de la especie en el área de estudio, cuya dispersión, probablemente, esta asociada al hombre.
- Las plantas de tipo cultivado de uchuva no presentan reducción de la diversidad genética con respecto a las plantas de tipo no cultivado, indicando un bajo impacto de las actividades de cultivo llevadas a cabo por el hombre en esta especie. La diversidad interespecífica hallada es fundamental para el manejo de la especie, en especial, para mantener su potencial evolutivo.

8. AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la IFS (Internacional Foundation for Science) y a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por aportar el dinero necesario para llevar a cabo esta investigación, también expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Hernández Torres por su invaluable apoyo técnico y logístico en el desarrollo del estudio y a Edgar Barrera por el soporte técnico.

LITERATURA CITADA

- Abu Assar, A. H., R. Uptmoor, A. A. Abdelmula, M. Salih, F. Ordon et al. 2005** Genetic Variation in Sorghum Germplasm from Sudan, ICRISAT, and USA Assessed by Simple Sequence Repeats (SSRs). *Crop Science* 45: 1636-1644.
- Aldrich, P. R., M. Jagtap, C. H. Michler, and J. Romero-Severson, 2003** Amplification of North American Red Oak Microsatellite Markers in European White Oaks and Chinese Chestnut. *Silvae Genetica* 52: 176-179.
- Assefa, K., A. Merker, and H. Tefera, 2003** Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Hereditas* 139: 174-183.
- Assogbadjo, A. E., T. Kyndt, B. Sinsin, G. Gheysen, P. Van Damme, 2006** Patterns of Genetic and Morphometric Diversity in Baobab (*Adansonia digitata*) Population Across Different Climatic Zones of Benin (West Africa). *Annals of Botany* 97: 819-830.
- Baldwin, J. T. Jr., and B. M. Speese, 1951** Cytogeography of *Physalis* in West Africa. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 78: 254-257.
- Bohonak, A. J., 2002** IBD (Isolation By Distance): A program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* 93: 153-154.
- Bonilla-Betancourt, M.L. and K. Espinosa-Piedrahita. 2003.** Colección, Caracterización Fenotípica y Molecular de Poblaciones de Uchuva *Physalis peruviana* L. *Tesis de Grado, Universal Nacional de Colombia – sede Palmira*.
- Bornet, B., and M. Branchard, 2001** Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly, and M. Branchard, 2002a** Genetic Diversity en European and Argentinian Cultivated Potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) Detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Genome* 45: 481-484.
- Bornet, B., C. Muller, F. Paulus, and M. Branchard, 2002b** Highly Informative Nature of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Sequences Amplified Using Tri- and Tetra-Nucleotide Primers from

DNA of Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome* 45: 890-896.

Bouvet, J-M., C. Fontaine, H. Sanou, C. Cardi, 2004 An Analysis of the pattern of Genetic Variation in *Vitellaria paradoxa* using RAPD markers. *Agroforestry Systems* 60: 61-69.

Chandler-Ezell, K., D.M. Pearsall, J.A. Zeidler 2006 Root and Tuber Phytoliths and Starch Grains Document Manioc (*Manihot esculenta*), Arrowroot (*Maranta arundinaceae*) and Llerén (*Calathea* sp.) at the Real Alto Site, Ecuador. *Economic Botany* 60: 103-120.

Cipriani, G., G. Lot, W. G. Huang, M. T. Marrazzo, E. Peterlunger et al. 1999 AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99: 65-72.

Clement, C.R., 1999 1492 and the loss of Amazonian Crop Genetic Resources. I. The relation between Domestication and Human Population Decline. *Economic Botany* 53: 185-202.

Collazos-Escobar O. Manejo Agronómico de Cultivos Potenciales: Uchuva (*Physalis peruviana* L.) y Agraz (*Vitis tiliifolia* H.B.K.) para Pequeños Productores de la Zona Indígena de Inza y Paez, Departamento del Cauca. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Regional 5, Popayan, Cauca, Colombia. Resumen Ejecutivo . 2006.
Ref Type: Report

Colunga-Garciamarin, P., E. Estrada-Loera, and F. May-Pat, 1996 Patterns of Morphological Variation, Diversity, and Domestication of Wild and Cultivated Populations of Agave in Yacatan, Mexico. *American Journal of Botany* 83: 1069-1082.

Colunga-Garciamarin, P., and F. May-Pat, 1997 Morphological Variation of Henequen (*Agave fourcroydes*, Agavaceae) Germplasm and its Wild Ancestor (*A. angustifolia*) Under Uniform Growth Conditions: Diversity and Domestication. *American Journal of Botany* 84: 1449-1465.

Corporación Colombia Internacional. Uchuva, promesa exportadora para las regiones frías de Colombia. Año 3 vol 12. 1999. Exótica.
Ref Type: Report

Corporación Colombia Internacional. Perfil de Producto Uchuva. Inteligencia de mercados. 13, 1-12. 2001.
Ref Type: Report

- Cox, T. S., J. P. Murphy, and M. Rodgers, 1986** Changes in Genetic Diversity in the Red Winter Wheat Regions of the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 5583-5586.
- Culley, T. M., and A. D. Wolfe, 2001** Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.
- da Costa-Chaves, A., M. Wulff-Schuch, and A. C. Erig, 2005** Estabelecimento e Multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. *Ciênc.agrotec., Lavras* 29: 1281-1287.
- Demesure, B., N. Sodji, and R. J. Petit, 1995** A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- Diamond, J., 2002** Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418: 700-706.
- Dickau, R., A.J. Ranere, R.G. Cooke, 2007** Starch Grain Evidence for the Preceramic Dispersals of Maize and Root Crops into Tropical Dry and Humid Forests of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 3651-3656.
- Dillehay, T.D., J. Rosen, T.C. Andres, D.E. Williams, 2007** Preceramic Adoption of Peanut, Squash and Cotton in Northern Peru. *Science* 316: 1890-1893.
- Djè, Y., G. C. Tahi, I. A. Zoro Bi, M. Malice, J. P. Baudoin et al. 2006** Optimization of ISSR Marker from African Edible-Seeded *Cucurbitaceae* species Genetic Diversity Analysis. *African Journal of Biotechnology* 5: 83-87.
- Doebley, J., 1992** Molecular Systematics and Crop Evolution. In: *Molecular Systematics of Plants* Soltis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J. Chapman and Hall, New York.
- Doyle, J. J., and J. S. Doyle, 1987** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem.Bull.* 19: 11-15.
- Espinal C.F., Martínez-Covaleda H.J. & Peña-Marín Y.** La Cadena de los Frutales de Exportación en Colombia: Una Mirada Global de su Estructura y Dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia Documento de Trabajo No. 67. 2005.
Ref Type: Report

- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. J. Crawford, J. L. Windus, and A. D. Wolfe, 1999** Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451.
- Estrada, E., and M. Martinez, 1998** *Physalis* (Solanaceae) and Allied Genera: Tzeltalia, a New Genus from the Highlands of Southern Mexico and Northwestern Guatemala. *Brittonia* 50: 285-295.
- FAO.** Plan de Acción Mundial para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura y la Declaración de Leipzig. Cuarta conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos, Leipzig, Alemania 17-23 de junio. 1996.
Ref Type: Conference Proceeding.
- Feingold, S., J. Lloyd, N. Norero, M. Bonierbale, and J. Lorenzen, 2005** Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* 111: 456-466.
- Fisher, G., V. Flórez, A. Sora, 2000** *Producción, poscosecha y exportación de la Uchuva (Physalis peruviana L.)* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía.
- Fofana, B., L. Harvengt, J. P. Baudoin, and P. du Jardin, 1997** New primers for the polymerase chain amplification of cpDNA intergenic spacers in *Phaseolus* phylogeny. *Belg J Bot* 129: 118-122.
- Frary, A., and S. Doganlar, 2003** Comparative Genetics of Crop Plant Domestication and Evolution. *Turk.J.Agric.For.* 27: 59-69.
- Gao, L. Z., C. H. Zhang, and J. Z. Jia, 2005** Cross-species transferability of rice microsatellites in its wild relatives and the potential for conservation genetic studies. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 931-940.
- Gepts, P., 2004** Crop Domestication as a Long-term Selection Experiment. *Plant Breeding Review* 24: 1-44.
- Ghislain, M., D. M. Spooner, F. Rodríguez, F. Villamón, J. Nuñez et al. 2004** Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet* 108: 881-890.

- Gil-Íñigo A.** European *Physalis* database.
<http://www.comav.upv.es/physalis.HTML>. 2008.
 Ref Type: Electronic Citation
- Gutierrez, M. V., M. C. Vaz Patto, T. Huguet, J. I. Cubero, M. T. Moreno et al. 2005** Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theor Appl Genet* 110: 1210-1217.
- Hall, T. A., 1999** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucl.Acids.Symp, Ser.* 41: 95-98.
- Hamilton, M. B., 1999** Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521-523.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan, 2001** PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- Harlan J. R., 1995** *The Living Fields - Our agricultural Heritage*. Cambridge University Press.
- Harlan J. R., 1992** *Crops and Man*. Madison, WI.
- Hijmans R.J., Cruz M.E. & Guarino L.** DIVA-GIS (version 5.4). Free mapping Program. <http://www.diva-gis.org/>. 2006.
 Ref Type: Electronic Citation
- Holsinger K.E. & Lewis P.O. HICKORY: A Package for Analysis of Population Genetic Data V.1.0.** <http://www.eeb.uconn.edu/>. 2003.
 Ref Type: Electronic Citation
- Holsinger, K. E., P. O. Lewis, and D. K. Dey, 2002** A Bayesian Approach to Inferring Population Structure from Dominant Markers. *Molecular Ecology* 11: 1157-1164.
- Ivey, C. T., and J. H. Richards, 2001** Genetic Diversity of Everglades Sawgrass, *Cladium jamaicense* (Cyperaceae). *International Journal of Plant Sciences* 162: 817-825.
- Jordan, W. C., M. W. Courtney, and J. E. Neigel, 1996** Low Levels of Intraspecific Genetic Variation at a Rapidly Evolving ChloroplastDNA Locus in North American Duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany* 83: 430-439.
- Kaplan, L. and T.F. Lynch, 1999** *Phaseolus* (Fabaceae) in Archaeology: AMS Radiocarbon Dates and their Significance for pre-Columbian archaeology. *Economic Botany* 53: 261-267

- Klinac, D. J., 1986** Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*) Production Systems. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 14: 425-430.
- Knudsen H.** Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera. 2000. Roma, Italia, International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Ref Type: Catalog
- Ladizinsky G., 1998** *Plant Evolution Under Domestication*.
- Lagos, T. C., C. M. Caetano, F. A. Vallejo, J. E. Muñoz, H. Criollo et al. 2005** Caracterización palinológica y viabilidad polínica de *Physalis peruviana* L. y *Physalis philadelphica* Lam. *Agronomía Colombiana* 23: 55-61.
- Lagos, T. C., 2006** Biología Reproductiva, Citogenética y Heterosis en parentales de Uvilla o Uchuva *Physalis peruviana* L. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia - sede Palmira.
- Lagos, T. C., F. A. Vallejo, and H. Criollo, 2007** Análisis de la aptitud combinatoria de algunas características del fruto de *Physalis peruviana* L. *Agronomía Colombiana* 25: 36-46.
- Lee, J. R., G. Y. Hong, A. Dixit, J. W. Chung, K. H. Ma et al. 2008** Characterization of microsatellite loci developed for *Amaranthus hypochondriacus* and their cross-amplifications in wild species. *Conservation Genetics* 9: 243-246.
- Legge A.P., 1974** Notes on the History, Cultivation and Uses of *Physalis peruviana* L. *Journal of the Royal Horticultural Society* 310-314.
- Lemes, M. R., T. M. Martiniano, V. M. Reis, C. P. Faria, and R. Gribel, 2007** Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for three species of *Theobroma* (Sterculiaceae) from the Brazilian Amazon. *Genet Resour Crop Evol* 54: 1653-1657.
- Ligarreto, G. A., M. Lobo, and A. Correa, 2005** Recursos genéticos del genero *Physalis* en Colombia, in *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.)*, edited by G.Fischer, D.Miranda, W.Piedrahita, and J.Romero. Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Lynch, M., and T. J. Crease, 1990** The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol.Biol.Evol.* 7: 377-394.
- Manen, J. F., A. Natali, and F. Ehrendorfer, 1994** Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergene region. *Plant Syst Evol* 190: 195-211.

- Martínez, L. E., P. F. Cavagnaro, R. W. Masuelli, and M. Zúñiga, 2006** SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Science* 170: 1036-1044.
- Mazorra, M. F., A. P. Quintana, Miranda D., G. Fischer, and M. Chaparro de Valencia, 2006** Aspectos Anatómicos de la Formación y Crecimiento del Fruto de Uchuva *Physalis peruviana* (Solanaceae). *Acta Biológica Colombiana* 11: 69-81.
- Medina, M., 1991** El Cultivo de la Uchuva tipo exportación. *Revista Agricultura Tropical* 28: 55-58.
- Menzel, M. Y., 1951** The Cytotaxonomy and Genetics of *Physalis*. *Proceedings of the American Philosophical Society* 95: 132-183.
- Merrick, L.C., 1995** Squashes, Pumpkins and Gourds: *Cucurbita* (Cucurbitaceae). In: Smartt J., N.W. Simmonds, *Evolution of Crop Plants* 2nd ed., 97-105.
- Milbourne, D., R. C. Meyer, A. J. Collins, L. D. Ramsay, C. Gebhardt et al. 1998** Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259: 233-245.
- Morgante, M., and A. M. Olivieri, 1993** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182.
- Mottura, M. C., R. Finkeldey, A. R. Verga, and O. Gailing, 2005** Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 5: 487-489.
- Nei, M., 1973** Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M., 1978** Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance From a Small Number of Individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Novoa, R. H., M. Bojacá, J. A. Galvis, and G. Fischer, 2006** La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12 °C (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Colombiana* 24: 77-86.
- Olmstead, R. G., J. A. Sweere, R. E. Spangler, L. Bohs, and J. D. Palmer, 1999** Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA, pp. 111-137 in *Solanaceae IV, advances in biology and utilization*, edited by M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester, and J. P. Jessop. Royal Botanic Gardens, Kew, UK..

- Otero-Arnaiz, A., A. Casas, J. L. Hamrick, and J. Cruse-Sanders, 2005** Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Molecular Ecology* 14: 1603-1611.
- Palma-Silva, C., M. M. Cavallari, T. Barbará, C. Lexer, A. Gimenes et al. 2007** A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and crossamplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* 7: 654-657.
- Palmer, J. D., 1987** Chloroplast DNA Evolution and Biosystematic Uses of Chloroplast DNA Variation. *the american naturalist* 130: S6-S29.
- Panda, S., J. P. Martin, and I. Aguinagalde, 2003** Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the *Brassica oleracea* L. group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis. *Theor Appl Genet* 106: 1122-1128.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton, and P. A. Fuerst, 1998** What Molecules Can Tell Us About Populations: Choosing And Using a Molecular Marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Peakall, R., S. Gilmore, W. Keys, M. Morgante, and A. Rafalski, 1998** Cross-Species Amplification of Soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) Within the Genus and Other Legume Genera: Implications for the Transferability of SSRs in Plants. *Mol.Biol.Evol.* 15: 1275-1287.
- Peakall, R., and P. E. Smouse, 2006** GENALEX6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peakall, R., P. E. Smouse, and D. R. Huff, 1995** Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* 4: 135-147.
- Peña-Lomelí A.** Situación Actual y Perspectivas de la Producción y Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. 2001. Ref Type: Report
- Petit, R. J., B. Demesure, and S. Dumolin-Lapègue, 1996** CpDNA and mtDNA primers, in *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*, edited by A. Karp, P. G. Isaac, and D. Ingram. Chapman & Hall.
- Pickersgill, B., 2006** Crop Domestication in the Andes and Lowland South America. *Encyclopaedia of plant and Crop Science* 1(1).

<http://www.dekker.com/sdek/abstract~db=enc~content=a71362368>
1.

- Pickersgill, B., 2007.** Domestication of plants in the Americas: Insights for Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany* 100: 925-940.
- Pickersgill, B. and C.B. Heiser, 1977** Origins and Distribution of Plants Domesticated in the New World Tropics. In: Reed, C.A., *Origins of Agriculture*. The Hague 803-835.
- Piperno, D.R. and K.V. Flannery, 2001** The Earliest Archaeological Maize (*Zea mays* L.) from Highland Mexico: New Accelerator Mass Spectrometry Dates and their Implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 2101-2103.
- Pons, O., and R. J. Petit, 1996** Measuring and Testing Genetic Differentiation With Ordered *Versus* Unordered Alleles. *Genetics* 144: 1237-1245.
- Portis, E., I. Nagy, Z. Sasvári, A. Stágel, L. Barchi et al. 2007** The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Science* 172: 640-648.
- Prevost, A., and M. J. Wilkinson, 1999** A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98: 107-112.
- Ramadan, M. F., and J. Mörsel, 2003** Oil Goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *J.Agric.Food Chem.* 969-974.
- Roa, A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. W. Bonierbale et al. 2000** Cross-Species Amplification of Cassava (*Manihot esculenta*) (EUPHORBIACEAE) Microsatellites: Allelic Polymorphism and Degree of Relationship. *American Journal of Botany* 87: 1647-1655.
- Rodríguez, N. C., and Bueno M.L., 2006** Estudio de la Diversidad Citogénica de *Physalis peruviana* L. (*Solanaceae*). *Acta Biológica Colombiana* 11: 75-85.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas, 2003** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Salazar, M. R., J. W. Jones, B. Chaves, and Cooman, 2008** A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Scientia Horticulturae* 115: 142-148

- Santana G. & Angarita A.** Regeneración Adventicia de Somaclones de Uchuva.
<http://www.agronomia.unal.edu.co/biblioteca/public/revista/artic/Fuchuv.htm> . 1999. Ref Type: Electronic Citation
- Sanwen, H., Z. Baoxi, D. Milbourne, L. Cardle, Y. Guimei et al. 2000** Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica* 117: 163-167.
- Shannon C. E., and W. Weaver, 1949** *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Small, R. L., J. A. Ryburn, R. C. Cronn, T. Seelanan, and J. F. Wendel, 1998** The Tortoise and the Hare: Choosing between Noncoding Plastome and Nuclear Adh Sequences for Phylogeny Reconstruction in a Recently Diverged Plant Group. *American Journal of Botany* 85: 1301-1315.
- Smartt, J., N. Simmonds, 1995** *Evolution of Crop Plants*. 2nd Ed. Longman, Harlow, Essex, UK
- Smith, B.D., 2005** Reassessing Coxcatlan Cave and the Early History of Domesticated Plants in Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 9438-9445.
- Smith, B. D., 2006** Eastern North America as an Independent Centre of Plant Domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12223-12228.
- Sol Genomics Network.** <http://www.sgn.cornell.edu/>. 2006. Ref Type: Electronic Citation
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet, 1991** Universal Primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17: 1105-1109.
- USDA A.N.G.R.P.** Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville Maryland. http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_site_acc.pl?NE9%20Physalis%20peruviana (15 August 2008). 2008. Ref Type: Electronic Citation
- Uzonova, M. I., and W. Ecke, 1999** Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* 118: 323-326.
- Vietmeyer N., 1989** *Lost Crops of the Incas. Little Known plants with Promise for world-wide cultivation*. Washington D.C.

- Vignes, H., M. Hossaert-McKey, D. Beaune, D. Fevre, M. C. Anstett et al. 2006** Development and characterization of microsatellite markers for a monoecious *Ficus* species, *Ficus insipida*, and crossspecies amplification among different sections of *Ficus*. *Molecular Ecology Notes* 6: 792-795.
- Villamizar, F., A. Ramírez, M. Menes, 1993** Estudio de la Caracterización física, morfológica y fisiológica poscosecha de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agrodesarrollo* 4: 305-320.
- Volpato, G., R. Marcucci, N. Tornadore, and M. G. Paoletti, 2004** Domestication Process of Two *Solanum* Section Lasiocarpa Species Among Amerindians in the Upper Orinoco, Venezuela, with Special Focus on Piaroa Indians. *Economic Botany* 58: 184-194.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, 1990** Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, pp. 315-322 in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White. Academy Press, San Diego, California, USA.
- Whitson, M., and P. S. Manos, 2005** Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the Physaloids: A Two-Gene Phylogeny of the Physalinae. *Systematic Botany* 30: 216-230.
- Wolfe, A. D., Q.-Y. Xiang, and S. R. Kephart, 1998** Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.
- Yi, G., J. M. Lee, S. Lee, D. Choi, and B. D. Kim, 2006** Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor Appl Genet* 114: 113-130.
- Zapata J.L., Saldarriaga A., Londoño M. & Díaz C.** Manejo del Cultivo de la Uchuva en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Regional 4, Centro de Investigación «La Selva», Rionegro, Antioquia, Colombia. Boletín Técnico. 42 páginas. 2002. Ref Type: Report
- Zhebentyayeva, T. N., G. L. Reighard, V. M. Gorina, and A. G. Abbott, 2003** Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theor Appl Genet* 106: 435-444.
- Zhivotovsky, L. A., 1999** Estimating Population Structure in Diploids with Multilocus Dominant DNA Markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda, 1994 Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Zohary, D., 2004 Unconscious Selection and the Evolution of Domesticated Plants. *Economic Botany* 58: 5-10.

ANEXOS

Anexo A

FORMATO IPGRI PARA LA COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL DE UCHUVA

Expedición / organización: Universidad Nacional de Colombia
(Instituto Colector)

País: Colombia

Equipo de Colectores:

Fecha de Colección:

Nombre Científico: *Physalis peruviana* L.

Nombre local / varietal: Uchuva

Localidad de Recolección:

Departamento:

Municipalidad:

Vereda:

Latitud: _____

Longitud: _____

Altitud: _____

Material: Semillas _____ Espigas _____ Raíces / Tubérculos _____
Plantas Vivas _____ Herbario _____ Esquejes _____

Situación de Colección: Cultivado: _____ Maleza: _____ Silvestre: _____

Muestra de Población: Línea Pura: _____ Individuo (- de 5): _____
Cultivar Primitivo: _____ Cultivar Mejorado: _____

Forma de Muestreo: Al azar: _____ Dirigido: _____ Ambos: _____

Fuente de Muestreo: Campo: _____ Tienda rural: _____ Mercado local: _____ Huerto casero _____
Instituto: _____ Tienda mercado: _____ Comercial: _____ Veg. Natural: _____ Jardín: _____

No. de plantas muestreadas:

Procedencia original de la muestra:

Frecuencia Abundante: _____ Frecuente: _____ Ocasional: _____ Rara: _____
:

Usos:

Observaciones de suelo: Textura: _____ Pedregosidad: _____ Drenaje: _____

Topografía: Pantano: _____ Vega inundable: _____ Plano aluvial: _____ Ondulado _____
Colinas: _____ Montañoso: _____ Relieve disectado: _____ Disecciones profundas: _____ Otros _____

Comunidad Vegetal:

Nombre del Instituto: Universidad Nacional de Colombia

Fecha: _____

No. de entrada (Accesión) a la institución: _____

Anexo B

Material Vegetal colectado y sus datos de pasaporte.

No. de Accesión	Fecha de colecta	Situación de Colección	Departamento	Municipio	Vereda	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Material Recolectado	Fuente de Muestreo	No. de Plantas Muestreadas
06Uch 0001	23/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Universidad de Pamplona	7°22'32,7"N	72° 39' 11"W	2291	Hojillas, Frutos	Jardín del Campus Universitario	1
06Uch 0002	24/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Chitaga	Tapurcua	7°13'01,8"N	72° 37' 57,2"W	1865	Herbario, Hojillas	A orilla de Camino	3
06Uch 0003	24/08/06	Cultivada	Norte de Santander	Chitaga	Carrillo	7° 1'31,2"N	72° 39' 06,1"W	1865	Frutos, Hojillas, Herbario	Cultivo Comercial	1
06Uch 0004	24/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Chitaga	Carrillo	7°11'31,2"N	72° 39' 06,1"W	1866	Hojillas, Frutos	Huerto Casero	1
06Uch 0005	24/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Barrio El Escorial	7°21'59,8"N	72°39'06,2"W	2403	Frutos, Hojillas, Herbario	Potrero Casa de Barrio	2
06Uch 0006	24/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Barrio San Pedro	7°22'08,2"N	72°39'06,1"W	2354	Frutos, Hojillas	Jardín Anterior Casa de Barrio	2
06Uch 0007	24/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Los Tanques	7°21'50,6"N	72°39'44,1"W	2404	Frutos, Hojillas, Herbario	Orilla de Carretera	2
06Uch 0008	25/08/06	Cultivo	Norte de Santander	Pamplona	El Escorial	7°21'20,5"N	72°38'51,3"W	2541	Frutos, Hojillas, Herbario	Cultivo Comercial	5
06Uch 0009	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Monte Adentro	7°20'48,1"N	72°40'03"W	2610	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	1
06Uch 0010	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Barrio Simón Bolívar	7°23'06,4"N	72°38'24,3"W	2450	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	2
06Uch 0011	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Barrio Simón Bolívar	7°23'11,6"N	72°38'23,7"W	2463	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	1
06Uch 0012	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Alcaparral	7°23'40,8"N	72°38'28,4"W	2432	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	2
06Uch 0013	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Alcaparral	7°23'51,5"N	72°38'32"W	2383	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	1
06Uch 0014	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Alcaparral	7°23'51,5"N	72°38'32"W	2384	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	1

06Uch 0015	25/08/06	Asilvestrada	Norte de Santander	Pamplona	Barrio Simón Bolívar	7°23'09,3"N	72°38'23,6"W	2465	Frutos, Hojillas, Herbario	Huerto Casero	1
06Uch 0016	25/08/06	Plaza de Mercado	Norte de Santander	Pamplona	Plaza de Mercado	7°22'32,7"N	72°39'11"W	2291	Frutos	Mercado Local	-
06Uch 0017	25/08/06	Plaza de Mercado	Norte de Santander	Pamplona	Plaza de Mercado	7°22'32,7"N	72°39'11"W	2292	Frutos	Mercado Local	-
06Uch 0018	25/08/06	Plaza de Mercado	Norte de Santander	Pamplona	Plaza de Mercado	7°22'32,7"N	72°39'11"W	2293	Frutos	Mercado Local	-
06Uch 0066	30/03/07	Asilvestrada	Santander	Floridablanca	Km. 6 Vía Bucaramanga Pamplona	7°07'33,2"N	73°05'19,6"W	-	Herbario, Frutos y Hojillas	Orilla de carretera	1
06Uch 0067	30/03/07	Asilvestrada	Santander	Floridablanca	Rosablanca	7°08'39,1"N	73°01'76,4"W	-	Herbario, Hojillas y frutos	Orilla de carretera	1
06Uch 0068	30/03/07	Asilvestrada	Santander	Tona	La corcova	7°07'83,6"N	73°00'52,2"W	-	Herbario y Hojillas	Orilla de Carretera	5
06Uch 0069	30/03/07	Asilvestrada	Santander	Tona	La corcova	7°08'37,8"N	73°01'42,7"W	-	Hojillas	Orilla de Camino	2
06Uch 0070	30/03/07	Asilvestrada	Santander	Tona	La corcova	7°08'52,0"N	73°01'59,7"W	-	Herbario, Frutos y Hojillas	Finca	3
06Uch 0071	31/03/07	Asilvestrada	Santander	Zapatoca	Zona urbana	6°48'84,8"N	73°16'02,6"W	-	Herbario, Frutos y Hojillas	Huerto Casero	3
06Uch 0072	31/03/07	Asilvestrada	Santander	Zapatoca	Zona urbana	6°48'90,1"N	73°15'97,5"W	-	Hojillas	Huerto Abandonado	1
06Uch 0073	31/03/07	Asilvestrada	Santander	Zapatoca	Zona urbana	6°48'97"N	73°15'95,9"W	-	Herbario, Frutos y Hojillas	Huerto Abandonado	1
06Uch 0074	31/03/07	Asilvestrada	Santander	Zapatoca	La flores	6°48'55,3"N	73°16'27,1"W	-	Hojillas	Orilla de camino	4
06Uch 0075	01/04/07	Plaza de Mercado	Santander	Zapatoca	Plaza de Mercado	6°48'74,8"N	73°16'26,8"W	-	Frutos, tamaño pequeño	Mercado Local	-

Anexo C

Extracción de ADN Genómico Total

- Pulverización del material
 - o Entre dos y tres foliolos se maceraron con Nitrógeno líquido en tubos Eppendorf con un macerador de plástico estéril, hasta tener el material totalmente pulverizado.
- Separación del ADN de compuestos orgánicos celulares
 - o El material se resuspendió en 200µL de Buffer CTAB para solubilizar las membranas celulares y 20µL de Sarkosyl (5%) para lisar las membranas lipídicas de las células; la suspensión se llevó al baño María a 65°C durante 10 minutos y posteriormente se mezcló muy bien con vórtex y se dejó reposar por 5 minutos; se añadieron 200µL de cloroformo/isoamil alcohol (24:1) para la purificación del ADN (la fase acuosa retiene el ADN, el ARN y algunos polisacáridos y la fase orgánica retiene lípidos, proteínas y la mayoría de los polisacáridos) y se centrifugó a toda velocidad por 5 minutos para separar las dos fases, la fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo Eppendorf .
- Precipitación del ADN
 - o Se añadieron 200µL de isopropanol para la precipitación del ADN, se dejó reposar por 5 minutos y se centrifugó para obtener el pellet de ADN; el sobrenadante se descartó y se realizó un lavado con 200µL de etanol al 70%, se centrifugó, se removieron todas las trazas de etanol y se secó a 37°C.
- Separación del ADN de compuestos orgánicos celulares
 - o El ADN se resuspendió en 100µL de TE, se puso al baño maría a 55°C por algunos minutos; se añadieron 100µL de cloroformo/isoamil alcohol (24:1); se centrifugó a toda velocidad por 5 minutos y se transfirió la fase superior a un nuevo tubo eppendorf.
- Precipitación del ADN
 - o El ADN se precipitó añadiendo 10µL de acetato de sodio 3M y 100 µL de isopropanol, se dejó reposar en hielo por 5 minutos y se centrifugó nuevamente por 2 minutos; se decantó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con 100µL de etanol al 70%, se eliminaron todas las trazas de etanol y se dejó secar la muestra incubando a 37°C, el pellet se resuspendió en 50µL de TE.

Anexo D

Regiones Microsatélites exploradas en *Physalis peruviana* L.

Locus	Unidad de Repetición	Secuencia cebador Forward	Secuencia cebador Reverse	Especie de diseño	Fuente
MIC3	AAC ₈	CTA ACT CAT CCG CTG ATT CAT C	AAT AAT TCT CTA CCC CCT CCT	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC48	ATC ₅	GTC AGC GAC AGA TTT AAG GTT C	GCC AAC GTA GTC ATT TGT CAG T	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC89	AAT ₄	CCT TGT CGT GGA CTT TAT TAT CC	CAC ACC TGC CTC TGA AAC G	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC98	AAC ₅	ATA CAA CCC TGC CCA AAA CC	GGC AGC GTA GTG ATG TAT ATA TTG G	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC102	AAC ₅	GGA TCC CTG TTA TTG TTG TC	CTG CAC CTA GAG CTG TAG TCA AA	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC242	ATC ₇	CCA TTG ACT GTG AAA TCG TG	CTG TTC ATT AGC AGT ATC AGC TC	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC269	AAC ₄	GTA GAA CCC TGT CTT CCA TAA GTG	GAC AGA GAG AAA CAA GAT TCA GTA G	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
MIC442	AG ₇	CTT TAT GGA CCA CTA TGT ATC TGA G	TCC TGA AAA GCC TCA TCT AAA C	<i>Physalis philadelphica</i>	(Chacón, 2006, comunicación personal)
SSR 43	TAC ₇	CTC CAA ATT GGG CAA TAA CA	TTA GGA AGT TGC ATT AGG CCA	<i>Solanum lycopersicum</i>	(Sol Genomics Network 2006)
SSR130	CAA ₇	AAA CCC TCA ACA CCA TCA CC	CAT CAT TTC TTT CAT GGC TCC	<i>Solanum lycopersicum</i>	(Sol Genomics Network 2006)
SSR140	CAG ₇	GTT TCA GCA GCC TGT CCA AT	TGA CAG CAT TTG GGT TTG AG	<i>Solanum lycopersicum</i>	(Sol Genomics Network 2006)
EPMS-596	(A)19	CTC GTG CCG TAT TTC TGT CA	AAG GGC GTG TTT GGT ATG AA	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-600	(A)32	ATG GGT ACG TGT TTG GGG TA	ACT TTA TTC CTC GTG CCG AA	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-601	(A)34	AAA TTG AGA ACA TCG GTG CC	TAA AGA AAG AGC CTC GTG CC	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-603	(A)39	GCG GTT CCC TAT TTG AAG AA	ATA GGG GGA ATT GGG TTC C	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-628	(T)19	TGC TCC TTA AGA CTG GCA CC	GGG TTC GGC TCT GTT ATT GA	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-629	(T)19	GCT CGA GGG AGA GAG ACT GT	GGT CAT ATG TTT CCA TGG GC	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-642	(AT)8	CAA CTT CGC GTT ATT GTC CA	AGG GCG GAC AAA GAA GAT TT	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-643	(CT)17	CCA AGA TCA ACT CTT ACG CTA T	CCC CTC AAG AAT TCC CTC CAT	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-648	(GA)7	TGT AAA ATA AAA TAA GGC TAA AGG CA	CAA GAA AGT GTG CCC CAA AT	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
EPMS-649	(TA)12	AAG GGT TCT CGA GGA AAT GC	TCA ATC CCA AAA CCA TGT GA	<i>Capsicum annuum</i>	(Portis et al. 2007)
HpmsE001	(ATT)5	TGC CAC CCA TAA AAT TCT TAA ACC A	TGC AAG ATC CCA AAT TGA AAT GA	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE002	(CT)19	GCA CGG CTC TAT ATC TCT CTA TCT T	GGA ACG AAA TCG ATC AAC ATC T	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)

HpmsE003	(TTC)6	TTT CTG CAA TTC CCC TTG TTC A	CAG CAG AGC CTT CAG TAG CAG C	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE004	(CAT)13	TGG GAA GAG AAA TTG TGA AAG CA	CAA TGC CAA CAA TGG CAT CCT A	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE005	(CACCAT)3	TGC CTC AGT TTC CCA ACC CT	ACC AAC ACC GTA ACG CAC CC	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE006	(T)22imp	GCT GAC CGT TTT CGT TTT GGG	CAA AAT TCA ACC GCA CCA ACA	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE007	(AT)12	CCC CAT TTC CCC TTC CCA TA	GAG GGG TCA TGT TGA AGG CAA	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE008	T14(AGT)5(GTT)3	CCC CTT AAC TTT TAA TTC TAG ATC TGC	TCG TTG TTC CTC CAT CAC CTC A	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE009	(A)23	TGC ACA AAC ATC ATA CAC CTC A	CCC ATG ACT GAT AGT CCG GGT C	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
HpmsE010	(C)12	CTG TTT GCC AAT CAC CAT CAG G	GCT ATT TTC CGG CGT GTG AGA G	<i>Capsicum annuum</i>	(Yi et al. 2006)
CM0005	(CCA)8	CAT GAC CAC CAT GAG GAT A	GAT AGC CAC GAG CAT AGT ATT	<i>Capsicum annuum</i>	(Sanwen et al. 2000)
CM0006	(AG)5	AGT TAA CAA CTT TGG TGC TGT	TAA TAT GGT AAG CAC ATT CCA	<i>Capsicum annuum</i>	(Sanwen et al. 2000)
CM0007	(AG)6	TGT TCC TCT CTC TTC TTA TCG	CCG GAG ATA AGA TCT TGA TAA	<i>Capsicum annuum</i>	(Sanwen et al. 2000)
Sti001	(AAT) _n	CAG CAA AAT CAG AAC CCG AT	GGA TCA TCA AAT TCA CCG CT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti003	(ACC) _n	ACC ATC CAC CAT GTC AAT GC	CTC ATG GAT GGT GTC ATT GG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti004	(AAG) _n	GCT GCT AAA CAC TCA AGC AGA A	CAA CTA CAA GAT TCC ATC CAC AG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti006	(AT) _n (GT) _n	CTT TAG TCC TTG GCA GAG CTT	CGG GCT GAT TCT TCT TCA TC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti009	(AGC) _n (AAC) _n	GCG AAA ACC TTG AAG CAA CT	CTG CTG TTG CTG TTG ATG GT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti012	(ATT) _n	GAA GCG ACT TCC AAA ATC AGA	AAA GGG AGG AAT AGA AAC CAA AA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti013	(ACC) _n	CCA CTT CCT CCA CTT CCA AA	CCA TGG TTG CAC CAA CTA GA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti014	(TGG) _n (AGG) _n	AGA AAC TGA GTT GTG TTT GGG A	TCA ACA GTC TCA GAA AAC CCT CT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti018	(GTT) _n	CCA CTA CTG CTT CCT CCA CC	GCA GCA ACA ACA AGC TCA AC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti022	(ACCCG) _n	TCT CCA ATT ACT TGA TGG ACC C	CAA TGC CAT ACA CGT GGC TA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti023	(GGC) _n (GGT) _n	GCG AAT GAC AGG ACA AGA GG	TGC CAC TGC TAC CAT AAC CA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti026	(TA) _n (GT) _n	CAA CGC TAC TCA ATG GCT CA	ACA ACT CTA GAA CGA GAG GAA CA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti029	(CA) _{imp} (TC) _{imp}	GAC TGG CTG ACC CTG AAC TC	GAC AAA ATT ACA GGA ACT GCA AA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti030	(ATT) _n	TTG ACC CTC CAA CTA TAG ATT CTT C	TGA CAA CTT TAA AGC ATA TGT CAG C	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti031	(TCA) _n	AGG CGC ACT TTA ACT TCC AC	CGG AAC AAA TTG CTC TGA TG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti032	(GGA) _n	TGG GAA GAA TCC TGA AAT GG	TGC TCT ACC AAT TAA CGG CA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti033	(AGG) _n	TGA GGG TTT TCA GAA AGG GA	CAT CCT TGC AAC AAC CTC CT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti043	(AAC) _{imp}	CAA TGC GAA TGT TGC TAC TGG T	ATC CAC CAA GAC CTC CAG AA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti046	(GAT) _n	CAG AGG ATG CTG ATG GAC CT	GGA GCA GTT GAG GGC TTC TT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti049	(TCTT) _n	GGA AGT CCT CAA CTG GCT G	TCA ACT ATA TGC CTA CTG CCC AA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti051	(TA) _n	GGT CTC CAT TAG CCC TCT GAG	ACA TAA ATG GAT CAC ACA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti053	(AT) _{imp}	TCA GAC CGG GTT CGA TGG	CGG CTT GAA TCA TTG CCC A	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti055	(AAG) _n	CCG TTG ATG GGA TTG CAC A	TGA TAT TAA CCA TGG CAG CAG C	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti060	(ATA) _n	ACT TCT GCA TCT GGT GAA GC	GGT CTG GAT TCC CAG GTT G	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
Sti063	(GAT) _{imp}	GCA TTC TAT GGC CAA CAT TGG	AGA TTC CTC CAA TTT CCC AGC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Feingold et al. 2005)
STM0019a	(AT)7(GT)10(AT)4 (GT)5(GC)4(GT)4	AAT AGG TGT ACT GAC TCT CAA TG	TTG AAG TAA AAG TCC TAG TAT GTG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Ghislain et al. 2004)

STM0025	(TG)13	GTT CAT GAT TGT GAA TGC TC	ATG ACT CAA CCC CAA ATG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM0028	(AC)12 (AT)5 (AG)8	CAT AAA TGG TTA TAC ACG CTT TGC	TAA TGG AGT TCC TGA AAA GAA AGG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM0030	Compound ((GT/GC) GT)8	AGA GAT CGA TGT AAA ACA CGT	GTG GCA TTT TGA TGG ATT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM0031	(AC)5 ... (AC)3(GCAC). (AC)2 (GCAC)2	CAT ACG CAC GCA CGT ACA C	TTC AAC CTA TCA TTT TGT GAG TCG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM0037	(TC)5 (AC)6 AA ... (AC)7 (AT)4	AAT TTA ACT TAG AAG ATT AGT CTC	ATT TGG TTG GGT ATG ATA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM0038	(TA)4 (TG)12	AAC TCT AGC AGT ATT TGC TTC A	TTA TTT AGC GTC AAA TGC ATA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1016	(TCT)9	TTC TGA TTT CAT GCA TGT TTC C	ATG CTT GCC ATG TGA TGT GT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1017	(ATT)5	GAC ACG TTC ACC ATA AAA	AGA AGA ATA GCA AAG CAA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1021	(C)17... (CT)8 (AT)9	GGA GTC AAA GTT TGC TCA CAT C	CAC CCT CAA CCC CCA TAT C	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1025	(T)15 (A)8	ATT TCG TTG CTT ACC TAC TA	AAC CCA AGA TTA CCA CAT TC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1031	(AT)13	TGT GTT TGT TTT TCT GTA T	AAT TCT ATC CTC ATC TCT A	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Ghislain et al. 2004)
STM1049	(ATA)6	CTA CCA GTT TGT TGA TTG TGG TG	AGG GAC TTT AAT TTG TTG GAC G	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1052	(AT)14 GT (AT)4 (GT)6	CAA TTT CGT TTT TTC ATG TGA CAC	ATG GCG TAA TTT GAT TTA ATA CGT AA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1053	(TA)4 (ATC)5	TCT CCC CAT CTT AAT GTT TC	CAA CAC AGC ATS CAG ATC ATC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1058	(ATT)5	ACA ATT TAA TTC AAG AAG CTA GG	CCA AAT TTG TAT ACT TCA ATA TGA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1064	(TA)12...(TG)4 GT (TG)5	GTT CTT TTG GTG GTT TTC CT	TTA TTT CTC TGT TGT TGC TG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1104	(TCT)5	TGA TTC TCT TGC CTA CTG TAA TCG	CAA AGT GGT GTG AAG CTG TGA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM1106	(ATT)13	TCC AGC TGA TTG GTT AGG TTG	ATG CGA ATC TAC TCG TCA TGG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM2013	(TCTA)6	TTC GGA ATT ACC CTC TGC C	AAA AAA AGA ACG CGC ACG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM2022	(CAA)3...(CAA)3	GCG TCA GCG ATT TCA GTA CTA	TTC AGT CAA CTC CTG TTG CG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM2030	(CA)3 (TA)5	TCT TCC CAA ATC TAG AAT ACA TGC	AAA GTT AGC ATG GAC AGC ATT TC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM3012	(CT)4 ... (CT)8	CAA CTC AAA CCA GAA GGC AAA	GAG AAA TGG GCA CAA AAA ACA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM3015	(CT)11...(CA)12	AGC AAT AAA GTC AAC ACT CCA TCA	AAT GAA TTA GGG GGA GGT GTG	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Milbourne et al. 1998)
STM3023a	(GA)9, (GA)8, (GA)4	AAG CTG TTA CTT GAT TGC TGC A	GTT CTG GCA TTT CCA TCT AGA GA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Ghislain et al. 2004)
STM5114	(ACC)n	AATGGCTCTCTCTGTATGCT	GCTGTCCCAACTATCTTTGA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*
STM5121	(TGT)n	CACCGGAATAAGCGGATCT	TCTTCCCTTCCATTGTCA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*
STM5127	(TCT)n	TTCAAGAATAGGCAAAACCA	CTTTTCTGACTGAGTTGCCTC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*
STGBSS	(TCT)9	AAT CGG TGA TAA ATG TGA ATG C	ATG CTT GCC ATG TGA TGT GT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Ghislain et al. 2004)
STPoAc58	(TA)13	TTG ATG AAA GGA ATG CAG CTT GTG	ACG TTA AAG AAG TGA GAG TAC GAC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Ghislain et al. 2004)
STWAX-2	(ACTC)5	CCC ATA ATA CTG TCG ATG AGC A	GAA TGT AGG GAA ACA TGC ATG A	<i>Solanum tuberosum</i> L.	(Ghislain et al. 2004)
STG0001	(CT)n	CAGCCAACATTTGTACCCCT	ACCCCACTTGCCATATTTT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*
STG0010	(TG)n	CGATCTCTGCTTTGCAGGTA	GTTCACTACTACCGCCGACT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*
STG0016	(AGA)n	AGCTGCTCAGCATCAAGAGA	ACCACCTCAGGCATTTCATC	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*
STG0025	(AAAC)n	TGGAATCCGAATTACGCTCT	AGGTTTTACCACTCGGGCTT	<i>Solanum tuberosum</i> L.	*

*Cebadores facilitados por el laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Nacional sede Bogotá.

Anexo E

Visualización de productos amplificados en geles de poliacrilamida

GEL DE POLIACRILAMIDA 6% (45 mL)

- 9mL TBE 5X
- 9mL solución de poliacrilamida (30%)
- 27mL agua desionizada
- 80µL de TEMED
- 400µL persulfato de Amonio

COLORACIÓN CON NITRATO DE PLATA

SOLUCIÓN FIJADORA

- 40mL etanol absoluto
- 4 mL ácido acético
- 400mL agua desionizada

SOLUCIÓN PLATA

- 0.34g nitrato de plata (AgNO_3)
- 50mL solución fijadora
- 100mL agua desionizada

SOLUCIÓN REVELADORA

- 4.5g hidróxido de sodio (NaOH)
- 250mL agua desionizada
- 2mL formaldehído

Los geles se sumergen en la solución fijadora durante 5 minutos, se retira la solución y se agrega la solución plata durante 10 minutos. Se descarta la solución plata y se lava el gel con agua desionizada, finalmente se agrega la solución reveladora. Todo el procedimiento descrito se debe llevar a cabo con agitación.

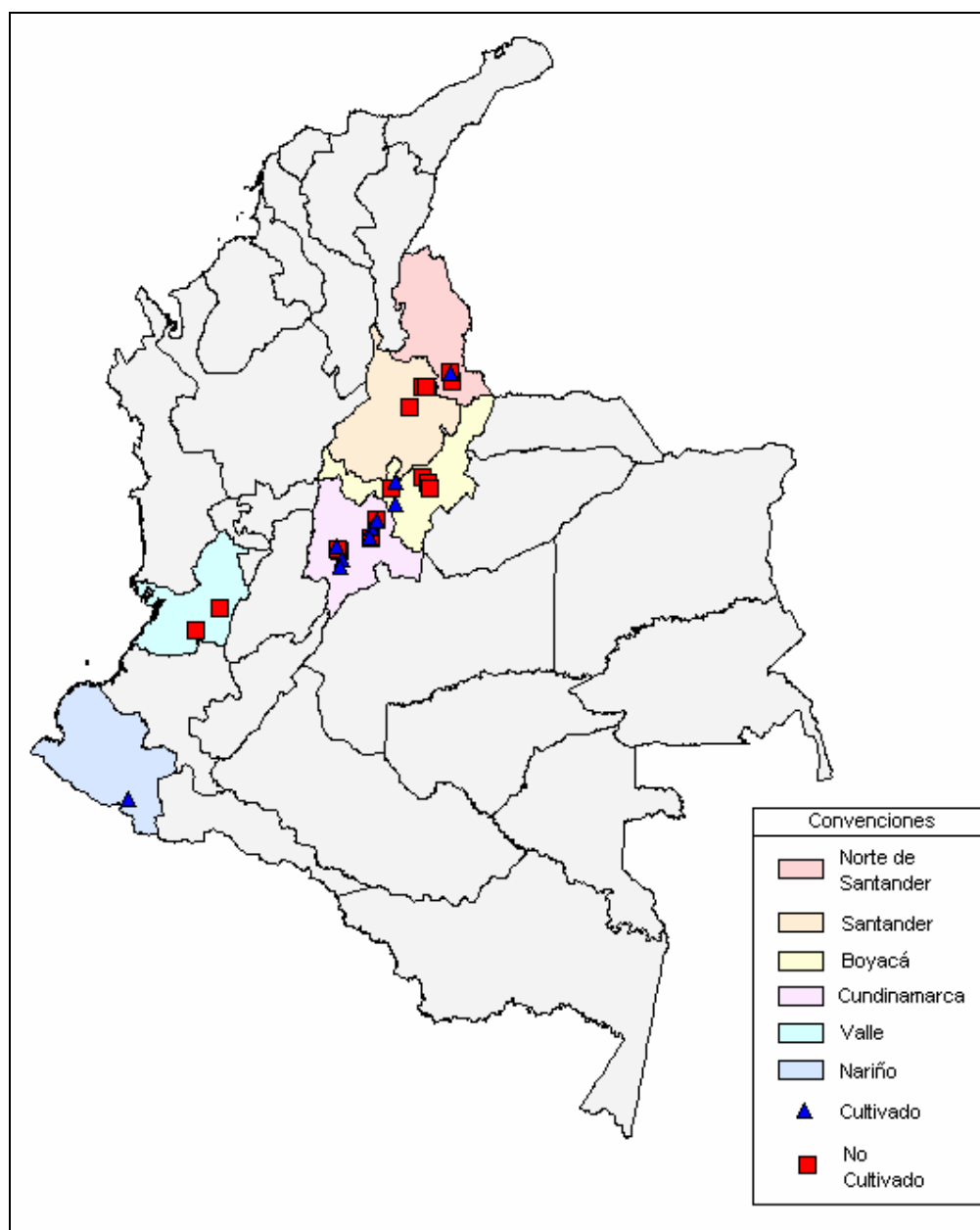
Anexo F

Regiones del ADN del cloroplasto y Región ITS exploradas en *Physalis peruviana* L.

Región	Secuencia cebador	5'-3'	Longitud (bp)	Fuente
<i>atpB</i> - <i>rbcL</i>	GAA GTA GTA GGA TTG ATT CTC TAC AGT TGT CCA TGT ACC AG	Forward Reverse	900 ¹	(Manen <i>et al.</i> 1994)
<i>rps14</i> - <i>psaB</i>	CAT TTC ACG AAG TAT GTG TCC G TGG CGT GGA TAT TGG CAG GA	Forward Reverse	600 ¹	(Fofana <i>et al.</i> 1997)
<i>petA</i> - <i>psbE</i>	GCA TCT GTT ATT TTG GCA CA TAC CTT CCC TAT TCA TTG CG	Forward Reverse	1200 ¹	(Fofana <i>et al.</i> 1997)
<i>psbC</i> - trNAser	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC GGT TCG AAT CCC TCT CTC TC	Forward Reverse	1600 ¹	(Demesure <i>et al.</i> 1995)
trNAser - trNAmet	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC CAT AAC CTT GAG GTC AGC GG	Forward Reverse	1250 ¹	(Demesure <i>et al.</i> 1995)
<i>TrnT</i> - <i>trnL</i>	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	Forward Reverse	800 ¹	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
<i>TrnL</i> intron	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Forward Reverse	630 ¹	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
<i>trnL</i> - <i>trnF</i>	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Forward Reverse	530 ¹	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
<i>rpl16</i> intron	CCA ACA CAT CAC TTC GGA TT GCT CCT CGC GAA TGA AGT AA	Forward Reverse	1210 ¹	(Jordan <i>et al.</i> 1996)
<i>accD</i> - <i>psaI</i>	GGA AGT TTG AGC TTT ATG CAA ATG G AGA AGC CAT TGC AAT TGC CGG AAA	Forward Reverse	700 ¹	(Small <i>et al.</i> 1998)
<i>trnS</i> - <i>trnG</i>	GCC GCT TTA GTC CAC TAC GC GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	Forward Reverse	844 ¹	(Hamilton 1999)
<i>ITS 1</i>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Forward	290 ²	(White <i>et al.</i> 1990)
<i>ITS 2</i>	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	Forward	290 ²	(White <i>et al.</i> 1990)
<i>ITS 3</i>	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	Reverse	330 ²	(White <i>et al.</i> 1990)
<i>ITS 4</i>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Reverse	?	(White <i>et al.</i> 1990)
<i>ITS 5</i>	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	Forward	315 ²	(White <i>et al.</i> 1990)

¹ Longitud en pares de bases según el mapa de cloroplasto de *Nicotiana tabacum*, ²Longitud según *Saccharomyces cerevisiae*

Anexo G



Mapa de Colombia en el que se muestra la distribución geográfica de las accesiones utilizadas en el estudio.