

2007B-2012B

207395728

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**Diversidad genética de *Physalis philadelphica* Lam. (Solanaceae) inferida con
microsatélites**

**TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA
ISAAC SANDOVAL PADILLA**

Las Agujas, Zapopan, Jal., Junio de 2014



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

**C. ISAAC SANDOVAL PADILLA
PRESENTE**

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**Diversidad genética de *Physalis philadelphica* Lam. (Solanaceae) inferida con microsatélites**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dra. Ofelia Vargas Ponce.**

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 19 de septiembre de 2013


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis, con el título: "Diversidad genética de *Physalis philadelphica* Lam (Solanaceae) inferida con microsatélites" que realizó el pasante Isaac Sandoval Padilla con número de código 207395728 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 13 de enero de 2014



Ofelia Vargas Ponce
 Director/a del trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Aarón Rodríguez Contreras		Abril 11, 2014
Dra. Luz Patricia Castro Félix		13-Ene-2014
Dra. Dánae Cabrera Toledo		14-Ene-2014
Supl. Dra. Georgina Vargas Amado		13-Enero/2014

Tesis realizada en el Laboratorio de Sistemática Molecular Vegetal del Instituto de Botánica del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, bajo la dirección de Dra. Ofelia Vargas Ponce

A Dios: por mi existencia y lo que me rodea.

A mis padres y hermanos: por el apoyo incondicional, por ser la fuerza motora que me ha permitido seguir adelante y por ser la mejor escuela.

A mi familia adoptiva: que aunque no nos una un lazo sanguíneo, me apoyaron y han sido parte importante en este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ofelia Vargas Ponce por haber sido parte importante en mi formación académica y haber estado de manera cercana en la culminación de mi carrera. Por su confianza y apoyo desde el principio de este trabajo, gracias.

A María del Pilar Zamora (Pili) por ser parte integral de este proceso, por su excelente capacitación y asesoría dentro y fuera del laboratorio.

A mis sinodales: Dr. Aarón Rodríguez, Dra. Luz Patricia Castro, Dra. Dánae Cabrera y Dra. Georgina Vargas (Gina), por sus valiosos comentarios y aportaciones para enriquecer este trabajo.

Un agradecimiento afectuoso a mis compañeros de carrera: Miguel Ángel Carrillo, Alejandra Domínguez, Deisy González, Thalía López, Claudia Orozco (Clau) y Patricia Virgen (Paty) por haber vivido con ustedes los mejores y los peores momentos durante la carrera, por haber compartido momentos de diversión, coraje, reflexión y frustración.

Muchas gracias a los compañeros del laboratorio: Lizeth Félix (Liz), Gina, Judith Morales, Guadalupe Munguía (Lupis), Pili, Virginia Ramírez (Viki) y Luis Villa, por su apoyo incondicional y por hacer que las jornadas de trabajo, así como las frustraciones fueran más llevaderas.

A la M. en C. Mollie Harker por apoyarme de forma constante durante una de las etapas más complicadas de este proceso. Ojalá más personas en este mundo tuvieran la calidad humana que usted tiene.

Gracias a los que con sus palabras y acciones me apoyaron y motivaron a seguir adelante. También, a los que alguna vez me expresaron que no podría lograrlo, porque sus palabras fueron el empuje adicional que me permitió la conclusión de este trabajo.

A todos, gracias. Una pequeña gran parte de esto ha sido gracias a cada uno de ustedes.

RESUMEN

Physalis philadelphica es una herbácea anual alógama, utilizada en México como alimento desde tiempos precolombinos. Los frutos de sus poblaciones silvestres, toleradas y cultivadas son recolectados para consumo y venta a lo largo del territorio nacional. El manejo humano ha contribuido a generar una diversidad morfológica amplia en ésta especie, que ha sido clasificada para su estudio en siete razas Arandas, Tamazula, Puebla, Salamanca, Manzano, Rendidora y Milpero. En el proceso de domesticación, la selección artificial y manejo de poblaciones de interés propician cambios morfofisiológicos y genéticos, por tanto pueden influir en la composición genética de las poblaciones. El objetivo de este estudio fue estimar la diversidad y estructura genética en *P. philadelphica* y determinar si estos parámetros han sido influenciadas por el manejo antropogénico. Se utilizaron 6 loci microsátelites en una muestra de 298 individuos de 13 poblaciones del centro y occidente de México, que representan los acervos del gradiente de manejo, 3 silvestres, 3 toleradas y 7 cultivadas. Los parámetros de diversidad y estructura se estimaron en tres niveles: a) especie, b) por categoría de manejo o acervo y c) por población. Los estimadores de diversidad revelan alta diversidad genética en la especie, tal como lo muestran el porcentaje de loci polimórficos ($P = 100\%$), número promedio de alelos por locus ($n = 14.666$), número efectivo de alelos por locus ($A_e = 7.457$), heterocigosidad observada y esperada ($H_o = 0.435$, $H_T = 0.844$); este patrón también se observa para los acervos y poblaciones individuales. La estructura genética, evaluada con θ de Weir y Cockerham, análoga al coeficiente de diferenciación F_{st} de Wright, para la especie es moderadamente alta ($\theta = 0.268$) mientras que entre categorías de manejo es baja ($\theta = 0.079$). De acuerdo a un análisis de varianza molecular (AMOVA) este valor de estructura es menor para el acervo total ($\Phi_{st} = 0.144$) y entre categorías de manejo ($\Phi_{ct} = 0.007$). Por su parte, la prueba de exactitud mostró que existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pares de poblaciones ($p < 0.05$). El análisis bayesiano de asignación de individuos mostró que, en las 13 poblaciones, el número de grupos genéticos más probable es $K = 12$. A partir de los resultados podemos discutir que *P. philadelphica* es una especie con alta diversidad genética, que es mayor en el acervo cultivado, intermedia en el silvestre y ligeramente menor en el tolerado. Al mantenimiento de la diversidad contribuyen factores como el entrecruzamiento obligado de la especie, el intercambio y mezcla de semillas entre productores, lo que introduce nuevos genotipos

y la historia evolutiva de cada población. Los valores moderados de diferenciación para la especie, a pesar de ser autoincompatible, podrían ser explicados por varios factores. En primer lugar el acervo de *P. philadelphica* es diverso y tiene amplia distribución; no obstante, la distancia entre poblaciones puede limitar el flujo génico entre algunas de ellas, mediado por la distancia de vuelo de los polinizadores. También pueden ser efecto de la deriva genética, el tamaño efectivo de las poblaciones y o cuellos de botella. Otro factor que contribuye a la diferenciación es el manejo antropogénico, éste incluye el uso de distintos criterios de selección y el fomento de diferentes variantes morfológicas, algunas de ellas restringidas a ciertas áreas geográficas; también influyen la presencia o ausencia de intercambio de semillas y una intensidad de manejo desigual entre poblaciones silvestres, toleradas y cultivadas. En resumen el manejo antropogénico no ha reducido la diversidad genética en *P. philadelphica* y tampoco parece modificar en gran proporción su estructura genética.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivos particulares	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Material Estudiado	9
Extracción de ADN y amplificación de microsatélites	9
Análisis de datos	12
I. Diversidad genética	12
II. Estructura genética	13
RESULTADOS	16
Diversidad genética	17
Estructura genética	17
DISCUSIÓN	23
Diversidad genética	23
Estructura genética	25
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Poblaciones de <i>Physalis philadelphica</i> estudiadas	10
Cuadro 2. Características de los cebadores microsatélites utilizados	10
Cuadro 3. Número de alelos y tamaño de los fragmentos amplificados por cebador	16
Cuadro 4. Diversidad genética de <i>Physalis philadelphica</i> por población, por categoría de manejo y en el acervo total	18
Cuadro 5. Estimadores de diferenciación genética análogos al estadístico F_{st} de Wright (1951) para 13 poblaciones de <i>Physalis philadelphica</i> , (θ) inferida a nivel del acervo total, entre categorías de manejo y dentro de cada categoría de manejo. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y valor de estructuración genética (Φ_{st})	19
Cuadro 6. Matriz de distancias genéticas (D , debajo de la diagonal) e identidad genética (I , encima de la diagonal) entre las poblaciones de <i>Physalis philadelphica</i> según Nei (1972)	19
Cuadro 7. Proporción de ancestría estimada (q) para las 13 poblaciones de <i>Physalis philadelphica</i> inferida con el método de Evanno <i>et al.</i> (2005) con Structure v. 2.3.4 (Pritchard <i>et al.</i> 2010)	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedencia de las poblaciones de <i>Physalis philadelphica</i> estudiadas	11
Figura 2. Patrones de bandeo en <i>Physalis philadelphica</i>	16
Figura 3. Fenograma con base en distancias genéticas de Nei (1972) entre poblaciones de <i>Physalis philadelphica</i>	20
Figura 4. El método de Evanno <i>et al.</i> (2005) muestra que el mayor valor de la probabilidad de grupos genéticos se encuentra en $K= 12$.	21
Figura 5. Coeficiente de ancestría estimado por individuo y agrupados por población. Cada individuo está representado por una línea vertical dividida o no en segmentos de color, con longitudes proporcionales a la ancestría del individuo a cada uno de los 12 grupos genéticos	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN en plantas (Doyle & Doyle 1987)	41
Anexo 2. Preparación y almacenamiento de reactivos para extracción	42
Anexo 3. Programa de amplificación utilizado para las PCR	43
Anexo 4. Preparación de solución de poliacrilamida	44
Anexo 5. Tinción con sales de plata (Sanguinetti 1994)	45

INTRODUCCIÓN

Physalis L. (Solanaceae) es un género nativo de América. Integra cerca de 90 especies (Martínez 1998). El centro de diversificación es México con 70 taxones, 50 % de ellos endémicos. En Estados Unidos, Centro y Sudamérica también crecen especies endémicas, que no exceden el 10 % del total del género (Martínez 1998). Varias especies de *Physalis* se encuentran en el Viejo Mundo, por introducciones post-colombinas, entre ellas *P. philadelphica* Lam., *P. pubescens* L. y *P. cordata* Mill. (Nee 1986, Martínez 1998).

Physalis está integrado por especies morfológicamente variables. Agrupa hierbas anuales o perennes y pocos arbustos. La mayoría de las perennes producen rizomas cortos y tuberculados o largos y engrosados. Las plantas pueden ser erectas, postradas o extendidas. Presentan ramificación dicotómica. Las flores son solitarias, pocas fasciculadas o en falsos racimos. Las flores son pediceladas, axilares y péndulas. La forma de la corola varía de rotada, campanulada a urceolada y del color amarillo al blanco o púrpura. Los frutos son bayas con semillas numerosas. El cáliz acrescente después de la antesis e inflado que cubre al fruto y la presencia de cinco máculas en el cuello de la corola unifican al género (Waterfall 1956, Nee 1986, Child y Lester 1991, Vargas *et al.* 2003).

Physalis incluye especies de importancia alimentaria y económica. *Physalis peruviana* L. se cultiva en la zona Andina, principalmente en Colombia, Perú y Ecuador. *Physalis grisea* (Waterf.) M. Martínez se aprovecha en Estados Unidos. *Physalis philadelphica* y *Physalis angulata* fueron domesticadas y son utilizadas en México. En este país, otras 16 especies silvestres se utilizan con fines alimenticios y medicinales (Martínez 1998, Lagos *et al.* 2005, Santiaguillo y Blas 2009).

Physalis philadelphica es una herbácea anual. Las plantas pueden ser postradas a erectas y alcanzan hasta 1 m de alto. Posee flores solitarias con corolas amarillas y maculas de color café claro. Las anteras son azules y después de la dehiscencia se tornan convolutas. El cáliz en la fructificación es globoso y presenta 10 costillas (Nee 1986, Vargas *et al.* 2003). Es una especie alógama y tiene incompatibilidad gametofítica (Pandey 1957). Es polinizada por abejas (Sullivan 1985, Adamson 2011). La dispersión de frutos y semillas la realizan aves, murciélagos y otros mamíferos; también puede deberse a la gravedad y escorrentía (Martin *et al.* 1961, Cippolini y Levey 1997).

Physalis philadelphica se distribuye de manera natural en México y Guatemala. Ha sido introducida de manera esporádica en Estados Unidos, Centroamérica y Las Antillas (Nee 1986). En México se encuentra presente en todo el país en altitudes que van desde los 0 hasta los 2800 msnm, con mayor frecuencia en climas templados húmedos y subhúmedos, cálidos húmedos y semihúmedos, semicálidos, secos o áridos (Cuevas Arias *et al.* 2008, Santiaguillo *et al.* 2009). Crece como ruderal mayormente en áreas tropicales. También ocurre como arvense en áreas perturbadas y modificadas por el hombre y puede ser tratada como maleza. Es tolerada y fomentada dentro de agroecosistemas como la milpa. Además se siembra como monocultivo o en asociación con otros cultivos (Montes 1991, Peña *et al.* 2007). Su área actual de distribución se extiende hasta el Caribe y América del sur y a países del Viejo Mundo como España e Italia por su introducción postcolombina, donde se promueve como un cultivo potencial (Long 1985).

En México, *P. philadelphica* es la más comúnmente aprovechada. Los frutos de las poblaciones silvestres, ruderales y arvenses, se recolectan para consumo familiar y venta local de agosto a octubre (Montes y Aguirre 1994). Su cultivo en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno facilitan la comercialización de sus frutos durante todo el año. El área de cultivo se ha extendido en los últimos 20 años incrementándose en 71% (Montes y Aguirre 1992, Sánchez *et al.* 2006, Ponce-Valerio *et al.* 2011). Este cultivo ocupa el tercer lugar en la producción de hortalizas en México (SIAP 2012). Por su condición alógama no se ha realizado mejoramiento genético a gran escala, existiendo a la fecha sólo dos variedades mejoradas (Rendidora y CHF1). De forma tal que, la producción se sustenta en variedades criollas que los propios productores usan y conservan (Peña 2001, Peña *et al.* 2008).

Por su importancia, se han conducido diversos estudios en *P. philadelphica*. Nee (1986), Vargas *et al.* (2003) y Cuevas *et al.* (2008) estudiaron sus características morfológicas y describieron su distribución geográfica y la vegetación donde se desarrolla. Otros trabajos han abordado su caracterización palinológica y viabilidad polínica (Lagos *et al.* 2005), fisiología de semillas (Pérez *et al.* 2012), germinación (Rivera *et al.* 1989) y composición química (Bock *et al.* 1995). Un mayor número de estudios se han enfocado en su propagación (Pérez y Granados 2001), fertilización (Gómez *et al.* 2006), nutrición (Magdaleno *et al.* 2006a) y efecto de sustratos (Magdaleno *et al.* 2006b). Montes y Aguirre (1992 y 1994) y Sánchez *et al.* (2006) examinaron aspectos etnobotánicos.

El uso de *P. philadelphica* es antiguo. Callen (1967) señaló que su cultivo y aprovechamiento en Mesoamérica tiene al menos una antigüedad de 900 a 200 a. C. Se han encontrado semillas de *Physalis* en sitios arqueológicos en Ozumba, Teopancaxco y Teotihuacán (McClung 1977, Long 1985) y otros del Valle de Tehuacán, Puebla, como Santa María, Palo Blanco y Venta Salada (Montes y Aguirre 1992, Long 2001), fechados entre 5000 y 3500 a. C. Lo que indica un período de uso mayor.

La domesticación de una especie, que inicia con el manejo y selección artificial, conlleva cambios y diversificación morfológica (Pickersgill 2007, Doebley *et al.* 2006). Esto es evidente en *P. philadelphica*. Al comparar poblaciones silvestres y cultivadas son notorios los cambios en frutos, flores, tallos y hojas (Montes *et al.* 1991). En las cultivadas los frutos son más grandes y pesados, pero fofos, con más pulpa verde. El cáliz que envuelve al fruto es más pequeño que éste y el número de frutos que produce la planta es menor. Las flores presentan un aumento de tamaño (Hudson 1986). En los tallos hay un aumento de grosor y disminución en el número de nudos en la primera bifurcación y en el número de ramificaciones. Las hojas son más grandes y precoces, pero tienen menos dientes en el borde. En general, las plantas tienden a ser precoces, glabras, altas y el peso de frutos por planta se ha incrementado (Montes *et al.* 1991).

En adición, la selección humana puede favorecer la formación de variedades dentro de una misma especie. Esto es posible por dos acciones centrales. Primero, la selección inicial de un subconjunto de la población (individuos de interés) causa un primer cuello de botella en el acervo genético primario, reduciendo la diversidad y diferenciándola de su población original. Segundo, la selección posterior de ciertos fenotipos dentro de las poblaciones manejadas o cultivadas causa también cuellos de botella y actúa sobre regiones particulares llamadas carga de selección o genes de selección. Estas regiones pueden involucrar un solo gen o un conjunto de loci cuantitativos (QTL's). A partir de éstas diferencias genéticas se explican las diferencias morfológicas observadas en las diferentes variedades (Díaz 2010, Doebley *et al.* 2006). Esta diversificación puede exceder el rango de variación fenotípica que poseen las poblaciones silvestres. También conduce a una adaptación local mediante la diferenciación de las variedades en un contexto geográfico (Purugganan y Fuller 2009).

En *P. philadelphica*, el aprecio de sus frutos y su amplia distribución geográfica han favorecido la selección de variedades locales. Estas cubren las preferencias de los productores (hábito de crecimiento, mayor precocidad, larga vida de anaquel) y consumidores (color, sabor, olor y tamaño del fruto). Sin embargo, los criterios de

selección pueden variar en las áreas donde se desarrolle este proceso. La selección, con fin de incrementar la producción comercial ha sido orientada a la obtención de plantas con frutos grandes y firmes, alto rendimiento, amplia adaptación y resistencia a enfermedades virales y a la cenicilla (*Oidium* spp.) (Montes y Aguirre 1994, Montes *et al.* 1991, Peña *et al.* 2007).

La diversidad morfológica de *P. philadelphica* ha sido agrupada en las razas Silvestre, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla (Peña *et al.* 2008). No obstante, sólo 11 variedades han sido registradas en el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). Sin embargo, muchas otras aun no son caracterizadas ni evaluadas con este fin. Esta variabilidad morfológica y la existencia de variedades criollas puede ser un indicador de variabilidad genética en la especie, lo que a su vez, es un reflejo de las circunstancias ecológicas y de manejo humano que las poblaciones han experimentado.

En contraparte, las plantas sujetas a manejo humano sufren cambios en su composición genética. La selección artificial recurrente tiene un efecto en las variantes alélicas y en la frecuencia de éstas dentro de las poblaciones (Freeman y Herron 2002). No obstante, en éstas poblaciones también ocurren fluctuaciones en las frecuencias alélicas debido a la mutación, migración, deriva génica y la selección natural. La mutación da origen a nuevos alelos, los que pueden ser eliminados o fijados por selección natural o por deriva génica. La migración puede tender a homogeneizarlas o diferenciarlas a través del flujo génico. A su vez, la deriva génica puede favorecer la pérdida de alelos al azar de una generación a otra, por lo que los individuos tienden a ser homocigotos en poblaciones pequeñas. Como resultado de estos cambios a lo largo de las generaciones se modifica la diversidad y estructura genética de las poblaciones (Freeman y Herron 2002, Moreno 2007).

Los cambios demográficos de las poblaciones también influyen en la diversidad y estructura genética. Estos están determinados por la dinámica demográfica de las poblaciones, regulada por factores internos y externos. Entre ellos destacan los procesos asociados al nacimiento, densidad poblacional, tamaño efectivo de la población, dispersión de organismos, tasas de extinción y de colonización, muerte, sistema de apareamiento, la historia de vida de la especie, así como cambios climáticos y geológicos (Freeman y Herron 2002, Klug *et al.* 2006, Moreno 2007).

La diversidad y estructura genética pueden inferirse con marcadores moleculares de ADN. Entre ellos, se encuentran los microsatélites, también conocidos como

Secuencias Simples Repetidas (SSR's), son secuencias cortas de ADN formadas de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem y localizados en regiones codificantes y no codificantes, por lo que algunos sirven para analizar regiones neutrales de ADN (González 2003, Rentería 2007). Son marcadores unilocus que exhiben un alto grado de polimorfismo, son codominantes, selectivamente neutros, segregan de manera mendeliana y su abundancia relativa permite un muestreo amplio del genoma (Rahman *et al.* 2000, González 2003, Azofeifa 2006, Rentería 2007, Valdés-Infante *et al.* 2010).

A nivel poblacional, los microsatélites son ampliamente utilizados (Rentería 2007). Permiten identificar, caracterizar, diferenciar y descifrar su historia evolutiva (Ríasco *et al.* 2003, Azofeifa 2006, Rentería 2007). Además, son tan específicos que permiten diferenciar individuos dentro de una población (Golubov y Ortega 2007). También han sido usados para evaluar la diversidad (Ghneim *et al.* 2008, Ribeiro *et al.* 2010); diferenciación (Balloux y Lugon 2002, Demarchi 2009); detección de cuellos de botella (Groombridge *et al.* 2000, Beebe y Rowe 2001); identificación de grupos genéticos (Godoy y Jordano 2001) y poblaciones más adecuadas para la conservación de una especie (Lamprea *et al.* 2004). Estos han sido utilizados para estudiar especies de importancia económica, como el maíz (*Zea mays* L.) (Ribeiro *et al.* 2010), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Buso *et al.* 2006, Ponciano *et al.* 2009), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Ríasco *et al.* 2003) y el arroz (*Oryza sativa* L.) (Ghneim *et al.* 2008).

Los estudios genéticos en *P. philadelphica* son escasos. Se han enfocado en un ensayo de modificación genética (Martínez *et al.* 2006); inferencia de la varianza genética, heredabilidad y correlaciones con base en atributos morfológicos (Moreno *et al.* 2002, Peña *et al.* 2008) y evaluación de la diversidad genética con ISSR's (inter secuencias simples repetidas) (Zamora 2010). La utilización de microsatélites se ha extendido a dos especies del género *Physalis*. Espinosa *et al.* (2004) identificaron microsatélites, diseñaron los cebadores y comprobaron su amplificación en *P. peruviana*. Por su parte, Vision *et al.* (2006) desarrollaron microsatélites para *P. philadelphica* e hicieron una primera evaluación de su utilidad analizando 69 individuos procedentes de 37 poblaciones de México con 12 loci microsatélites. No obstante, estos marcadores no han sido utilizados para evaluar la diversidad y estructura genética en poblaciones de *P. philadelphica* con diferente grado de manejo. Esto permitiría identificar el efecto de la selección humana sobre los niveles de variación y estructura del acervo manejado.

JUSTIFICACIÓN

Physalis philadelphica tiene importancia etnobiológica, histórica y económica en México. Desde tiempos prehispánicos ha formado parte de las sociedades rurales como un recurso de recolección (Mac Neish 1966) a partir de plantas silvestres y arvenses toleradas. A lo largo de su área de distribución, se fomenta su desarrollo en agroecosistemas junto a maíz, frijol y calabaza (Montes 1991) mediante la disseminación de sus semillas dentro del cultivo. De igual forma, variedades criollas y algunas variedades mejoradas se producen en monocultivos. La comercialización de sus frutos, a lo largo del tiempo, ha establecido la interconexión entre las sociedades rurales y urbanas, manteniéndose la preferencia de su consumo. El proceso de selección artificial y cultivo recurrente ha favorecido su variación morfológica (Montes *et al.* 1991) y generación de variedades. En este contexto, es importante evaluar la diversidad genética existente en poblaciones de *P. philadelphica* con distinto grado de manejo. La información generada permitirá conocer los niveles de variación y estructura genética. También facilitará la comparación de la diversidad morfológica con la diversidad genética para desarrollar estrategias de manejo.

HIPÓTESIS

La intensidad de selección artificial ha sido desigual en las poblaciones de *Physalis philadelphica*. En consecuencia, cabría esperar una disminución de la diversidad genética en poblaciones con mayor intensidad de manejo. En este sentido, la diversidad genética será mayor en poblaciones silvestres, intermedia en toleradas y menor en cultivadas. Al mismo tiempo, los acervos silvestre, tolerado y cultivado presentarán una clara estructura genética.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estimar la diversidad genética de *Physalis philadelphica*.

Objetivos particulares

- Calcular la diversidad genética de *Physalis philadelphica* en poblaciones silvestres, toleradas y cultivadas.
- Estimar la estructura genética interpoblacional y entre las categorías de manejo.
- Determinar el efecto de la intensidad de manejo en los niveles de diversidad genética en *Physalis philadelphica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

Se seleccionaron 13 poblaciones de *Physalis philadelphica* del centro-occidente de México con diferente grado de manejo. Tres poblaciones son silvestres, tres toleradas y siete cultivadas (Cuadro 1). Las poblaciones silvestres provienen de los estados de Aguascalientes, Jalisco y Zacatecas. Las toleradas fueron obtenidas en los municipios de Cuautla, Unión de Tula y Yahualica, Jalisco. Las cultivadas provienen de los estados de México, Guanajuato, Jalisco y Morelos. Éstas representan a poblaciones criollas diferenciadas y reconocidas como distintas variedades por los productores (Cuadro 1, Figura 1). Tres de ellas proceden de diferentes parcelas ubicadas en el municipio de Cuquío y corresponden a la variedad Tomate Verde. Otra población cultivada proviene del municipio de Ixtlahuacán del Río y es reconocida como la variedad Morada. Ambos municipios son parte de la región productora de tomate en Jalisco. Las tres poblaciones restantes han sido obtenidas mediante programas de mejoramiento sobre materiales criollos que han generado las variedades Diamante en Texcoco, Estado de México; la Rendidora en Zacatepec, Morelos y la Salamanca de Salamanca, Guanajuato (Figura 1). El material vegetal de tres poblaciones cultivadas (Cuadro 1) se obtuvo a partir de la compra de frutos en el mercado local. De estos frutos, se realizó una extracción y germinación de semillas y del total de plántulas obtenidas se seleccionaron 5 hojas jóvenes de 24 individuos por población. En las otras 10 poblaciones las hojas se colectaron de manera directa en campo. En ambos casos, las muestras se colocaron en sobres de papel aluminio, se etiquetaron y almacenaron en hielo para su procesamiento en laboratorio.

Extracción de ADN y amplificación de microsatélites

La extracción de ADN y amplificación de microsatélites se realizó en el Laboratorio de Sistemática Vegetal Molecular, del departamento de Botánica y Zoología, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara. El método de extracción empleado fue el de Doyle y Doyle (1987). Se tomaron 3 hojas jóvenes por individuo de entre 20 y 24 individuos de cada una de las 13 poblaciones (Cuadro 1). Se cuantificó y determinó la calidad del ADN con espectrofotómetro (Genova, Jenway). Se hicieron diluciones de ADN a una concentración final de 40 ng/μl. Se utilizaron seis pares de cebadores, de los 12

sugeridos por Vision *et al.* (2006), para la amplificación de microsatélites. Estos fueron seleccionados por ser más polimórficos y reproducibles (Cuadro 2).

Cuadro 1. Poblaciones de *Physalis philadelphica* estudiadas.

Grado de manejo	Número y código	N	Estado	Localidad	Lat. N	Long. W	Altitud msnm
Silvestres	1. AGS ⁺	24	Aguascalientes	Aguascalientes	21°53'	102°17'	1818
	2. VAL ⁺	24	Zacatecas	Valparaíso	22°42'	103°31'	2086
	3. ZAP ⁺	24	Jalisco	Zapotlanejo	20°37'	103°04'	1523
Toleradas	4. UT ⁺	20	Jalisco	Unión de Tula	20°06'	104°12'	1416
	5. YAH ⁺	24	Jalisco	Yahualica	21°13'	102°52'	1787
	6. CUA ⁺	24	Jalisco	Cuautla	20°12'	104°24'	1724
Cultivadas	7. CG ⁺	21	Jalisco	Cuquío	20°56'	103°03'	1778
	8. CR ⁺	23	Jalisco	Cuquío	20°56'	103°02'	1776
	9. CO ⁺	22	Jalisco	Cuquío	20°57'	103°02'	1823
	10. DIA [*]	22	Edo. de México	Texcoco	19°29'	98°53'	2259
	11. REN [*]	24	Morelos	Zacatepec	18°39'	99°11'	925
	12. MOR ⁺	24	Jalisco	Ixtlahuacán del Río	20°52'	103°09'	1781
	13. SAL [*]	22	Guanajuato	Salamanca	20°34'	101°11'	1716

N = Número de individuos, ⁺ = Población obtenida en campo y * = Población obtenida en mercado local.

Cuadro 2. Características de los cebadores microsatélites utilizados.

Locus	Secuencia del cebador (5'-3')	Repetición
MIC3	F: CTAATCATCCGCTGATTCCT R: AATAATTCTCTACCCCTCCT	(AAC) ₈
SSR43	F: CTCAAATTGGGCAATAACA R: TTAGGAAGTTGCATTAGGCCA	(TAC) ₇
SSR130	F: AAACCCTCAACACCATCACC R: CATCATTTCTTTCATGGCTCC	(CAA) ₇
SSR140	F: GTTTCAGCAGCCTGTCCAAT R: TGACAGCATTGGGTTTGAG	(CAG) ₇
MIC301	F: CACAAGAGTTAGGTCCATTTACTTG R: CCGATAAGTAAACCTAACTGGAC	(AC) ₇
MIC341	F: AGTGAGTTATCTGGTAGTCATCCTG R: TGTAAGAAACACCACTCTATGTCTC	(CA) ₉ (GA) ₉

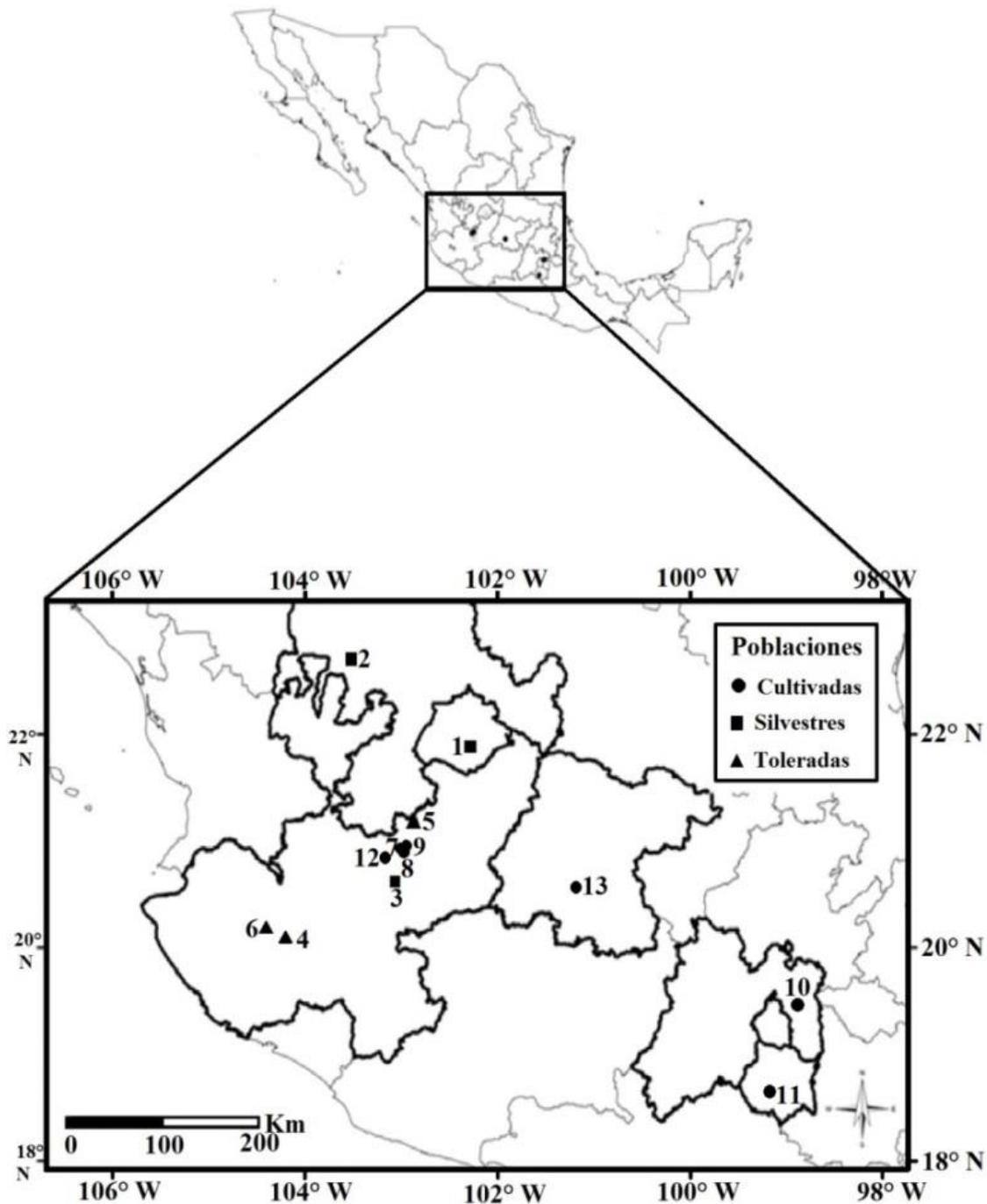


Figura 1. Procedencia de las poblaciones de *Physalis philadelphica* estudiadas. El código numérico de la población como se indica en el Cuadro 1.

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR en un termociclador (Select Cycler, Select BioProducts). Las reacciones de amplificación se realizaron a un volumen final de 20 μ l. Cada reacción incluyó 160 ng de ADN, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 0.2 mmoles de cada cebador, 0.2 mmoles de dNTP's, 2 mmoles de $MgCl_2$ y 1X de amortiguador de reacción. Las condiciones de amplificación incluyeron: un

ciclo de desnaturalización inicial a 94° durante 5 min, seguido de 35 ciclos de tres pasos que consistieron en desnaturalización a 94° durante 30 s, alineación a la temperatura de los cebadores (55° para los cebadores SSR130, SSR140 y MIC341 y 56.6° para los cebadores MIC3, MIC43 y SSR301) durante 1 min y una extensión a 72° durante 2 min y un paso final de extensión a 72° durante 5 min.

Los productos de la amplificación fueron separados en electroforesis vertical. Se prepararon geles de poliacrilamida 6 % urea 7 M en amortiguador. La electroforesis fue realizada en una cámara dual (CBS Scientific) utilizando amortiguador de corrimiento TBE 1X a 250 V constantes durante 4 horas. Para la visualización de los productos amplificados se empleó la técnica de tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.* 1994).

Análisis de datos

Para analizar las imágenes de los geles se utilizó un sistema de fotodocumentación digital (Gel Logic 100, Kodak). Las imágenes incluyeron una columna de referencia de marcador de peso molecular de 100 pb (pares de bases) (Invitrogen) para estimar el tamaño en pb de cada una de las bandas. Los fragmentos amplificados se documentaron usando el programa Phoretix 1D v10 (Totalab Ltd.). Con los datos obtenidos se construyó una matriz de datos de tipo codominante con los genotipos de cada individuo. Los parámetros de diversidad y estructura se estimaron en tres niveles: a) especie, en la que se agrupan las 13 poblaciones estudiadas, b) por categoría de manejo considerando el acervo silvestre, el tolerado y el cultivado y c) por población.

Diversidad genética

Para estimar la diversidad genética se utilizaron cinco parámetros: 1) porcentaje de loci polimórficos (P), 2) número promedio de alelos por locus (n), 3) número efectivo de alelos por locus (A_e), 4) heterocigosidad observada (H_o) y 5) heterocigosidad esperada (H_e) según Nei (1978). Estos se calcularon con los programas PopGene v. 1.31 (Yeh *et al.* 1999) y Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer 2010).

La proporción de loci polimórficos se estimó con la fórmula:

$$P = \frac{x}{m}$$

donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci.

El número promedio de alelos por locus (n), es el promedio de los alelos detectados en todos los loci y se calculó como:

$$n = (1/K) \sum_{i=1}^k n_i$$

donde K es el número de loci y n_i es el número de alelos en cada loci.

El número efectivo de alelos (A_e) es el número de alelos que pueden estar presentes en una población y se estimó con la siguiente fórmula:

$$A_e = 1/(1 - h) = 1/ \sum p_i^2$$

donde p_i es la frecuencia del i -ésimo alelo en el locus y h la heterocigosidad del locus.

La heterocigosidad observada es la proporción observada de loci heterocigóticos por individuo y se calculó:

$$H_o = \text{No. de genotipos heterocigóticos} / \text{No. de genotipos analizados}$$

La heterocigosidad esperada es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. Se calcula de 3 maneras diferentes:

1. Un locus con dos alelos: $h_j = 1 - p^2 - q^2$
2. Un locus j con i alelos: $h_j = 1 - \sum p_i^2$
3. Promedio para varios loci: $H_e = \sum h_j / L$

donde h_j es la heterocigosidad por locus; p y q son las frecuencias alélicas; H_e es la heterocigosidad promedio para varios loci y L es el número total de loci.

Estructura genética

La estructura genética se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, es un indicador de la similitud o diferenciación. La estructura genética se evaluó utilizando cinco parámetros: 1) índice de diferenciación $\theta - (F_{st})$ de Wright (1951); 2) análisis de Varianza Molecular mediante el coeficiente Φ_{st} ; 3) prueba no paramétrica de probabilidad combinada de Fisher o prueba de exactitud (Raymond y Rousset 1995); 4) distancia genética de Nei (D) (Nei 1972) representada gráficamente mediante un análisis de agrupamiento utilizando el método del grupo promedio con media aritmética no ponderada (UPGMA); 5) análisis bayesiano de asignación de individuos. Estos parámetros se obtuvieron empleando los programas TFPGA v. 1.3 (Miller 2000), Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer 2010), Structure v.

2.3.4 (Pritchard *et al.* 2010) y Structure Harvester (Earl y vonHoldt 2012 <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).

El índice de diferenciación entre poblaciones (F_{st}) también llamado θ ayuda a localizar la variación existente a varios niveles de organización y se calcula con base en la fórmula:

$$F_{st} = 1 - \frac{H_s}{H_t}$$

donde H_t es la diversidad genética total o heterocigosidad esperada en la población y H_s es la heterocigosidad promedio esperada por cada subpoblación. Cuando F_{st} tiende a cero no hay diferenciación poblacional y la población está en equilibrio Hardy-Weinberg. Por el contrario, si F_{st} tiende a 1 las poblaciones están totalmente diferenciadas entre sí. Se aplicaron 10000 réplicas de muestreo con reemplazo para generar un intervalo de confianza (IC) del 95% (Felsenstein 1985).

La prueba de probabilidad combinada de Fisher o prueba de exactitud (Raymond y Rousset 1995) emplea un método de simulaciones de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) y proporciona una aproximación a la probabilidad de diferenciación interpoblacional a través de las diferencias observadas en frecuencias alélicas. Un valor de 1 indica una probabilidad del 100 % de que las diferencias observadas se deban al azar y loci con valores de p menores a 0.05 presentan una diferencia estadísticamente significativa en sus frecuencias entre poblaciones.

La distancia genética de Nei (D) (Nei 1972) evalúa la similitud o nivel de variación compartida entre grupos o poblaciones. El valor de cero indica frecuencias alélicas iguales para las poblaciones; en cambio, cualquier cifra diferente a cero y hasta infinito muestra que las frecuencias alélicas entre las poblaciones son diferentes e incluso pueden llegar a no compartir ningún alelo a distancias mayores. Para calcular este índice, se requiere obtener la identidad genética (I), que expresa la probabilidad de que la selección al azar de un alelo entre dos poblaciones diferentes (x y y) sea igual a la probabilidad de encontrar alelos idénticos dentro de cada una de las poblaciones. La matriz de distancias genéticas entre las poblaciones estudiadas es utilizada para hacer un análisis de agrupamiento.

Por último, se realizó una prueba de estructuración genética con análisis bayesiano de asignación de individuos y el programa Structure v. 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2010). El programa emplea un algoritmo Bayesiano, que agrupa probabilísticamente el

número de poblaciones o grupos genéticamente distintos (K), con base en un método de remuestreo apoyado en simulaciones de MCMC. Se asumió un modelo en el cual las poblaciones analizadas pudieran haber estado agrupadas entre 1 y 13 poblaciones, cada una de ellas caracterizándose por presentar un determinado conjunto de haplotipos determinado por los alelos de cada locus. La corrida se efectuó utilizando los parámetros recomendados por default, es decir, 250,000 iteraciones de MCMC con 50,000 réplicas de dememorización. Para cada K , se hicieron 10 repeticiones. El valor de K con mayor probabilidad posterior se determinó con base en el método de Evanno *et al.* (2005), el cual considera la variación generada por el error de muestreo, mediante el programa Structure Harvester (Earl y vonHoldt 2012 . <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).

RESULTADOS

Se evaluaron 298 individuos, en promedio 23 por población. Se identificaron 88 alelos, de los cuales 17 fueron amplificados con el cebador MIC3, 13 con el cebador SSR43 y SSR130, 14 con el cebador SSR140, 20 con el cebador MIC301 y 11 con el cebador MIC341 (Cuadro 3). De ellos, 15 fueron alelos únicos, uno para la población cultivada SAL y la población tolerada UT; dos para la población silvestre AGS, la población tolerada YAH y la población cultivada CR; tres para la población cultivada MOR y cuatro para la población cultivada DIA. El tamaño de los alelos varió de 120 a 440 pares de bases (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de alelos y tamaño de los fragmentos amplificados por cebador.

Locus	Número de alelos	Tamaño (pb)
MIC3	17	180-275
SSR43	13	180-245
SSR130	13	130-200
SSR140	14	120-235
MIC301	20	280-440
MIC341	11	178-238

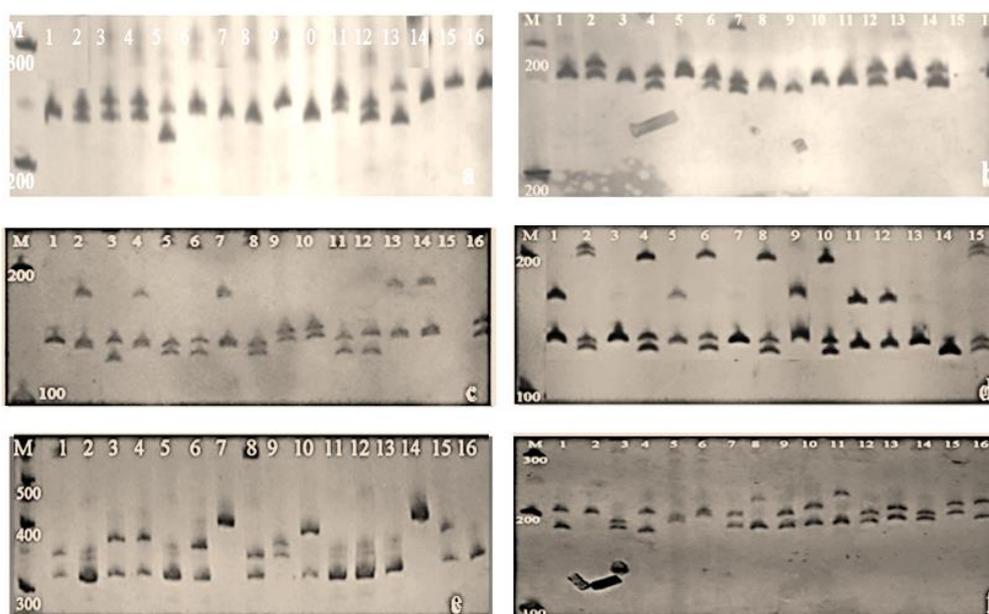


Figura 2. Patrones de bandeo en *Physalis philadelphica*.

^a tolerada (UT) con MIC3, ^b silvestre (ZAP) con SSR43, ^c cultivada (SAL) con SSR130, ^d silvestre (VAL) con SSR140, ^e tolerada (YAH) con MIC301 y ^f cultivada (MOR) con MIC341.

Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos total, por categoría de manejo y para cada una de las poblaciones de *P. philadelphia* fue del 100 % (Cuadro 4). El número promedio de alelos por locus fue $n = 14.67$. Los valores de este parámetro por categoría de manejo fueron $n = 9.17$ para las silvestres y toleradas y $n = 13.33$ para las cultivadas, mientras que por población individual varió de $n = 4.33$ hasta $n = 6.33$. El estimador del número efectivo de alelos por locus indicó un valor de $A_e = 7.46$ para el acervo total. El acervo silvestre presentó un valor de $A_e = 5.54$, las toleradas de $A_e = 5.44$ y las cultivadas de $A_e = 7.19$. Este valor varió de $A_e = 2.78$ a $A_e = 4.21$ entre las 13 poblaciones (Cuadro 4).

La heterocigosidad observada para todas las poblaciones estudiadas fue $H_o = 0.44$, para el acervo silvestre de $H_o = 0.43$, para el tolerado de $H_o = 0.51$ y para el cultivado de $H_o = 0.49$. En las poblaciones silvestres estos valores fluctuaron de $H_o = 0.42$ a $H_o = 0.45$, en las toleradas de $H_o = 0.44$ a $H_o = 0.56$ y en las cultivadas de $H_o = 0.40$ a $H_o = 0.58$. En adición, la heterocigosidad esperada (Nei, 1978) en el total de las poblaciones de *P. philadelphia* estudiadas fue de $H_T = 0.84$. Los valores de heterocigosidad esperada por categoría de manejo fueron $H_T = 0.80$ en las silvestres, $H_T = 0.70$ en las toleradas y $H_T = 0.85$ en las cultivadas. A nivel poblacional, el parámetro H_e , mostró valores que van de $H_e = 0.59$ a $H_e = 0.68$ en las poblaciones silvestres, de $H_e = 0.61$ a $H_e = 0.65$ en las toleradas y en las cultivadas de $H_e = 0.45$ a $H_e = 0.74$ (Cuadro 4).

Estructura genética

Entre las 13 poblaciones de *P. philadelphia* el valor de diferenciación estimado con θ de Weir y Cockerham (1984) análoga al coeficiente F_{st} de Wright (1951), fue de $\theta = 0.268$. Entre las tres categorías de manejo este alcanzó un valor de $\theta = 0.079$. Por su parte, las poblaciones del acervo de silvestres poseen una $\theta = 0.262$, las toleradas de $\theta = 0.138$ y las cultivadas de $\theta = 0.293$ (Cuadro 5).

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) mostró que la mayor variación se encuentra entre los genotipos dentro de las poblaciones con cerca del 86 %. El porcentaje de la varianza entre poblaciones dentro de las categorías de manejo alcanzó un valor del 13.72 % mientras que entre las categorías de manejo es del 0.71 %. El valor de estructuración genética del acervo total de *P. philadelphia* fue de $\Phi_{st} = 0.144$ ($p < 0.05$) y entre categorías de manejo de $\Phi_{ct} = 0.007$ ($p < 0.05$) (Cuadro 5). La prueba de probabilidad combinada de Fisher o prueba de exactitud (Raymond y Rousset, 1995)

mostró que existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pares de poblaciones con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Diversidad genética de *Physalis philadelphica* por población, por categoría de manejo y en el acervo total.

Número ^a	Código	N	<i>n</i>	<i>A_e</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>P</i>
Población							
1	AGS ¹	24	6.33	4.21	0.42	0.59	100
2	VAL ¹	24	6.33	3.72	0.45	0.65	100
3	ZAP ¹	24	4.83	3.12	0.43	0.68	100
4	UT ²	20	5.83	4.21	0.56	0.65	100
5	YAH ²	24	5.17	3.41	0.44	0.61	100
6	CUA ²	24	5.00	3.35	0.53	0.62	100
7	CG ³	21	5.33	3.32	0.54	0.74	100
8	CR ³	23	4.50	2.78	0.44	0.68	100
9	CO ³	22	5.17	3.74	0.43	0.59	100
10	DIA ³	22	4.83	3.38	0.55	0.66	100
11	REN ³	24	4.33	2.78	0.48	0.56	100
12	MOR ³	24	4.83	2.99	0.40	0.45	100
13	SAL ³	22	5.33	3.36	0.58	0.66	100
Categoría de manejo							
				<i>H_o</i>	<i>H_t</i>	<i>P</i>	
	Silvestres	72	9.17	5.54	0.43	0.80	100
	Toleradas	68	9.17	5.44	0.51	0.70	100
	Cultivadas	158	13.33	7.19	0.49	0.85	100
Acervo total							
				<i>H_o</i>	<i>H_T</i>	<i>P</i>	
	<i>Physalis philadelphica</i>	295	14.67	7.46	0.44	0.84	100

^a Código numérico de la población, ¹ silvestre, ² tolerada, ³ cultivada, N = número de individuos por población, *n* = número de alelos por locus, *A_e* = alelos efectivos, *H_o* = heterocigosidad observada, *H_e* = heterocigosidad esperada, *P* = porcentaje de loci polimórficos, *H_e* = heterocigosidad esperada por categoría de manejo, *H_e* = heterocigosidad esperada total.

La identidad genética *I* (Nei 1972) entre las poblaciones analizadas varió de 0.058 a 0.730. Entre las poblaciones silvestres los valores de identidad variaron de 0.243 a 0.370. En las toleradas oscilaron entre 0.678 y 0.730 y en las cultivadas entre 0.117 y 0.660. La distancia genética *D* (Nei 1972) estimada a partir de la *I* entre las 13 poblaciones fluctuó de 0.314 a 2.842. En las poblaciones silvestres los valores variaron de *D* = 1.003 a 1.416, en las toleradas oscilaron entre *D* = 0.314 y 0.389 y en las cultivadas entre *D* = 0.415 y 2.147 (Cuadro 6).

Cuadro 5. Estimadores de diferenciación genética análogos al estadístico F_{st} de Wright (1951) para 13 poblaciones de *Physalis philadelphica*. θ inferida a nivel del acervo total, entre categorías de manejo y dentro de cada categoría de manejo. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y valor de estructuración genética (Φ_{st}).

	Weir & Cockerham (1984)			AMOVA Excoffier <i>et al.</i> (1992)				
	θ	σ	IC 95 %	SC	g. l.	CV	% V	Estadísticos Φ
Acervo total	0.268	± 0.063	(0.390, 0.166)	244.857	595	0.417	0.71	$\Phi_{st} = 0.144^*$
Dentro de las poblaciones				208.047	583	0.357	85.57	
Entre poblaciones				29.862	10	0.057	13.72	
Entre categorías de manejo	0.079	± 0.023	(0.124, 0.041)	6.949	2	0.003	0.71	$\Phi_{ct} = 0.007^*$
Dentro del acervo o categoría de manejo								
Silvestres	0.262	± 0.075	(0.411, 0.150)					0.268 [*]
Toleradas	0.138	± 0.013	(0.160, 0.116)					0.136 [*]
Cultivadas	0.293	± 0.071	(0.424, 0.173)					0.196 [*]

σ = desviación estándar, IC= Intervalo de confianza, SC= suma de cuadrados, g. l.= grados de libertad, CV= componentes de la varianza, %V= porcentaje de variación. * $p < 0.05$

Cuadro 6. Matriz de distancias genéticas (Nei 1972) entre poblaciones de *Physalis philadelphica*. Valores por debajo de la diagonal corresponden a D . Los valores de I se muestran por encima de la diagonal.

Número ^a		AGS	VAL	ZAP	UT	YAH	CUA	CG	CR	CO	DIA	REN	MOR	SAL
1	AGS ¹	****	0.243	0.360	0.262	0.272	0.284	0.183	0.435	0.432	0.184	0.058	0.187	0.086
2	VAL ¹	1.416	****	0.370	0.345	0.305	0.267	0.448	0.438	0.257	0.263	0.213	0.396	0.240
3	ZAP ¹	1.027	1.003	****	0.49	0.438	0.577	0.539	0.376	0.495	0.354	0.380	0.466	0.220
4	UT ²	1.340	1.065	0.713	****	0.686	0.730	0.657	0.314	0.341	0.199	0.415	0.726	0.194
5	YAH ²	1.301	1.188	0.826	0.376	****	0.678	0.660	0.241	0.190	0.238	0.298	0.680	0.255
6	CUA ²	1.257	1.319	0.549	0.314	0.389	****	0.683	0.41	0.403	0.262	0.422	0.730	0.209
7	CG ³	1.698	0.803	0.619	0.421	0.416	0.381	****	0.381	0.290	0.248	0.485	0.660	0.306
8	CR ³	0.832	0.827	0.977	1.158	1.423	0.892	0.964	****	0.477	0.267	0.220	0.375	0.260
9	CO ³	0.838	1.360	0.703	1.077	1.662	0.908	1.239	0.741	****	0.181	0.125	0.222	0.199
10	DIA ³	1.695	1.336	1.040	1.612	1.435	1.340	1.395	1.321	1.712	****	0.162	0.219	0.256
11	REN ³	2.842	1.548	0.969	0.881	1.212	0.863	0.724	1.516	2.077	1.820	****	0.387	0.117
12	MOR ³	1.677	0.926	0.763	0.321	0.385	0.315	0.415	0.981	1.504	1.52	0.950	****	0.180
13	SAL ³	2.453	1.429	1.518	1.640	1.367	1.566	1.183	1.351	1.613	1.361	2.147	1.710	****

^aCódigo numérico de la población. ¹ Silvestre, ² Tolerada, ³ Cultivada

El fenograma generado con las distancias genéticas (Nei, 1972) y el método de agrupación UPGMA se muestra en la Figura 3. Una distancia de corte de 1.554 generó

dos grupos. El primero (I) está formado por dos poblaciones de cultivo comercial, DIA y SAL. El valor de soporte de remuestreo (bootstrap) es de 40 % y se unen entre sí con una distancia de 1.361. El segundo (II) incluye las once poblaciones restantes y se subdivide en tres subgrupos a una distancia de corte 1.325 con un valor de soporte de 19 %. El grupo IIA está constituido por siete poblaciones, tres de ellas cultivadas (CG, MOR y REN), tres toleradas (YAH, CUA, UT) y una silvestre (ZAP). La población silvestre VAL constituye el subgrupo IIB. El tercer subgrupo IIC reúne a dos poblaciones cultivadas de Cuquío (CR y CO) y la silvestre AGS. El valor de soporte del subgrupo IIA y IIC es cercano al 50 % mientras que en el IIB es del 11 %.

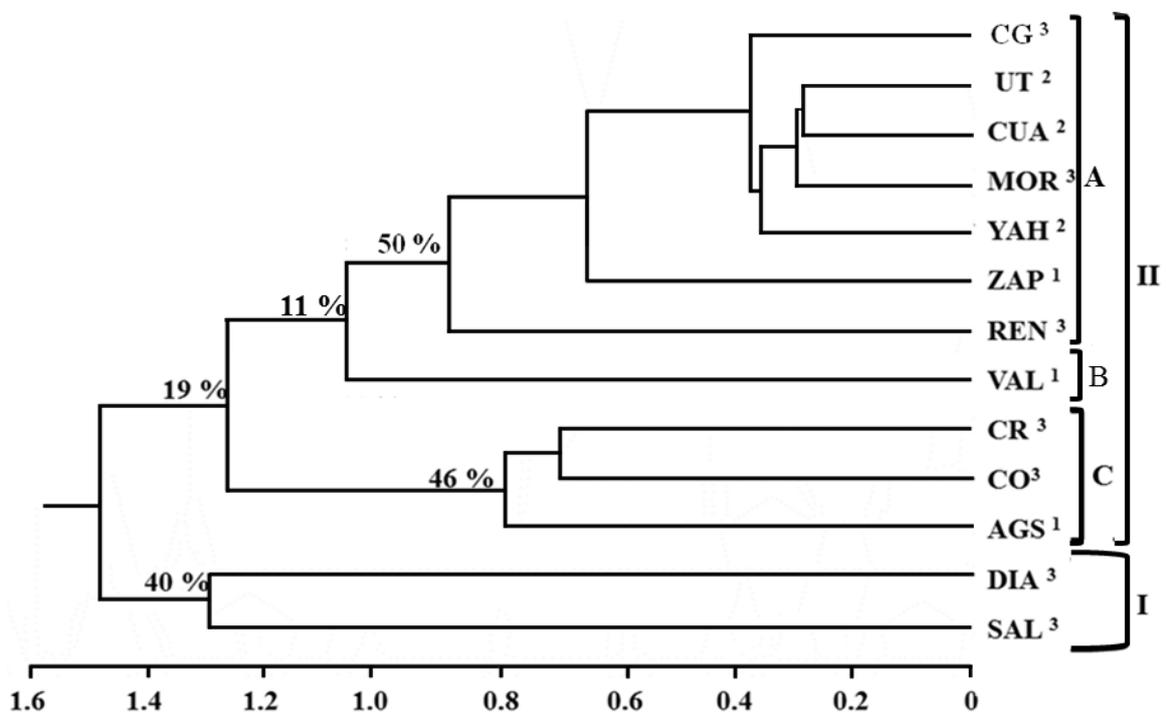


Figura 3. Fenograma con base en distancias genéticas de Nei (1972) entre poblaciones de *Physalis philadelphica*. ¹ Silvestre, ² Tolerada, ³ Cultivada.

El análisis bayesiano de asignación de individuos mostró que el número de grupos genéticos más probable es $K = 12$ (Figura 4), esto siguiendo el criterio de Pritchard *et al.* (2010) y corroborado con el método de Evanno *et al.* (2005). En detalle se aprecia que las poblaciones cultivadas DIA, REN y SAL y la silvestre AGS se comportan como poblaciones puras, se conforman por una proporción de haplotipos pertenecientes a la misma población al 100 % y no presentan ancestría reciente respecto a las restantes poblaciones ($q = 1$). Las poblaciones silvestres VAL y UT y las cultivadas CO y MOR manifiestan de cerca la tendencia mencionada ($q = 0.92$ a 0.99), seguidas de la población cultivada CR con un valor de pertenencia un poco más bajo (q

= 0.83). Por su parte, la población silvestre ZAP, las toleradas CUA y YAH presentan valores de pertenencia a su propia población menores ($q = 0.65$ a $q = 0.70$) y comparten ancestría reciente con otras poblaciones. La cultivada CG exhibe el valor más bajo de $q = 0.354$ (Cuadro 7 y Figura 5).

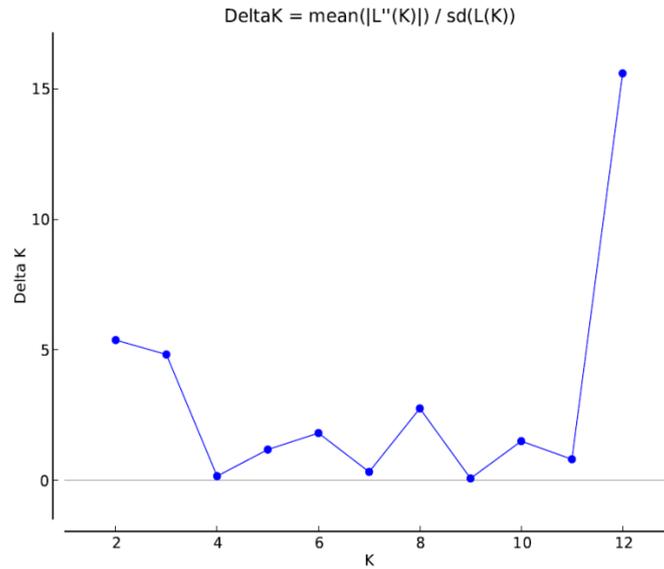


Figura 4. El método de Evanno *et al.* (2005) muestra que el mayor valor de la probabilidad de grupos genéticos se encuentra en $K=12$.

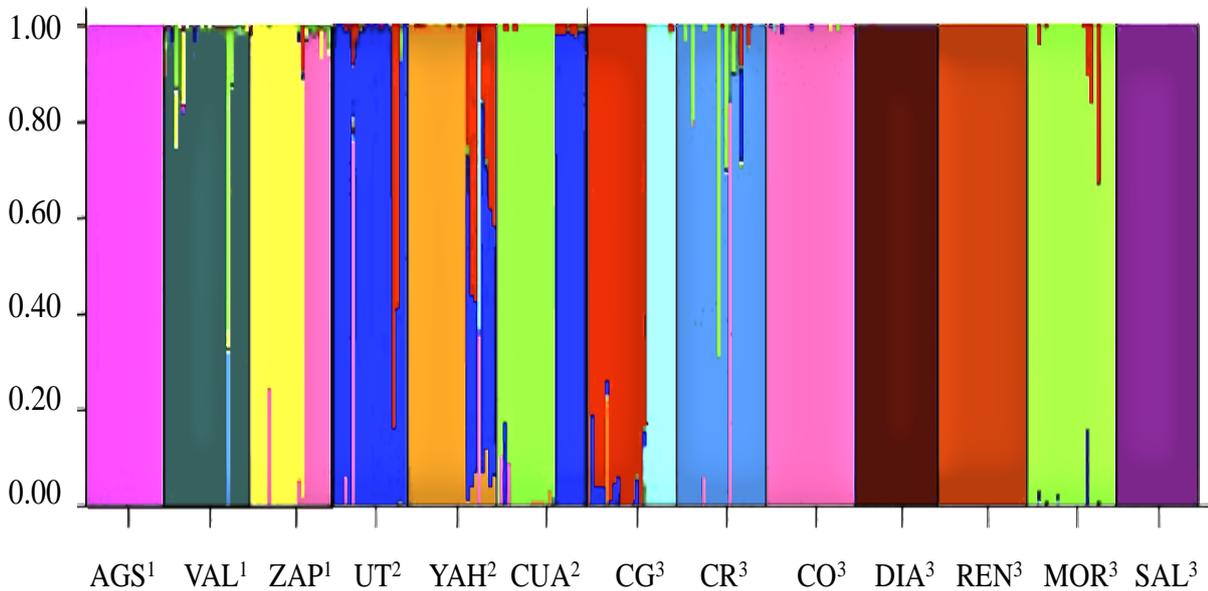


Figura 5. Coeficiente de ancestría estimado por individuo y agrupados por población. Cada individuo está representado por una línea vertical dividida en segmentos de color, la longitud es proporcional a la ancestría del individuo con cada uno de los 12 grupos genéticos.

Cuadro 7. Proporción de ancestría estimada (q) para las 13 poblaciones de *Physalis philadelphica* (Pritchard *et al.* 2010).

Población	Grupo genético											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 AGS ¹	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
2 VAL ¹	0.000	0.000	0.002	0.000	0.019	0.000	0.005	0.915	0.000	0.001	0.016	0.039
3 ZAP ¹	0.000	0.323	0.002	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.668	0.005
4 UT ²	0.000	0.048	0.934	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.001	0.000	0.012
5 YAH ²	0.000	0.016	0.249	0.000	0.000	0.000	0.706	0.000	0.000	0.026	0.000	0.002
6 CUA ²	0.000	0.008	0.335	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.654
7 CG ³	0.000	0.022	0.568	0.000	0.000	0.000	0.037	0.008	0.000	0.354	0.001	0.003
8 CR ³	0.000	0.038	0.016	0.000	0.832	0.000	0.001	0.058	0.000	0.001	0.000	0.053
9 CO ³	0.000	0.994	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
10 DIA ³	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11 REN ³	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12 MOR ³	0.000	0.000	0.034	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.963
13 SAL ³	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

¹ Silvestre, ² Tolerada, ³ Cultivada. En negrita se resaltan los valores más altos de ancestría.

DISCUSIÓN

Diversidad genética

En *Physalis philadelphica*, la diversidad genética es alta. El 100% de los loci son polimórficos. El número promedio de alelos por locus es de 14.666. El número efectivo de alelos por locus suma 7.457. La heterocigosidad observada llegó a 0.435 y la esperada asciende a 0.844. Los valores son superiores a los característicos para plantas anuales, con sistema de polinización cruzada y de distribución amplia analizadas con izoenzimas ($H_e = 0.186$, $P = 59$, Hamrick y Godt 1996). Zamora (2010) encontró alta diversidad genética para esta misma especie analizando nueve poblaciones pertenecientes a los acervos silvestre, tolerado y cultivado. Sin embargo y con base en ISSR's, los valores de H_T (0.26) y P (86%) son más bajos que los encontrados aquí. En *Capsicum annum* L., Contreras *et al.* (2011) refieren valores de $P = 80\%$, $n = 5.53$ y $H_e = 0.395$ a partir del análisis de 62 poblaciones con 19 pares de cebadores microsátélites. Por su parte, en *Allium sativum* L. Cunha *et al.* (2012) registran valores de $n = 4.4$, $H_o = 0.468$ y $H_e = 0.576$ con base en la evaluación de 75 accesiones y 16 pares de cebadores SSR. Esto indica que *P. philadelphica* tiene alta diversidad genética.

La diversidad genética de *P. philadelphica* varía entre categorías de manejo. Los valores de n , A_e y H_t fueron mayores en cultivadas y menor en silvestres y toleradas (Cuadro 4). En cambio, el valor de H_o fue superior para toleradas, intermedio para cultivadas e inferior en silvestres. El valor de $P = 100\%$ fue igual en las tres categorías (Cuadro 4). Montes *et al.* (1991) sugieren una relación inversa entre la intensidad de manejo humano y los niveles de diversidad genética. De acuerdo a esta afirmación, la diversidad será mayor en el acervo silvestre, intermedio en el tolerado e inferior en el cultivado. Los resultados obtenidos contradicen la observación. La diversidad genética es mayor en el acervo cultivado, intermedio en el silvestre e inferior en el tolerado.

En *P. philadelphica* los acervos silvestre, tolerado y cultivado presentan altos valores de diversidad genética pero diferentes entre ellos. Este fenómeno no solo se ha documentado en esta especie. En *Beta vulgaris* L., Desplanque *et al.* (1999) encontraron altos niveles de diversidad genética en 82 poblaciones empleando SSR. Además, se detectaron diferencias entre la diversidad de los acervos, siendo mayor en las silvestres ruderales ($n = 16$, $H_o = 0.766$ y $H_e = 0.867$), seguido del cultivado ($n = 9$, $H_o = 0.657$ y $H_e = 0.719$) y un poco menor en el silvestre ($n = 13$, $H_o = 0.609$ y $H_e = 0.823$).

En el acervo cultivado el entrecruzamiento e intercambio y mezcla de semillas pueden incrementar la variación genética de la especie. Estos procesos son influidos por polinizadores y agricultores quienes introducen nuevos genotipos a las poblaciones. Esto se evidencia en las poblaciones CG, CR y CO, donde los agricultores intercambian semillas y la mezclan con el germoplasma propio. Esto no es exclusivo de *P. philadelphica*, también ocurre en poblaciones de *Citrullus lunatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai de Brasil. En ellas, el intercambio de germoplasma ha aumentado la posibilidad de recombinación genética, influyendo en el incremento de diversidad genética incluso en muestras geográficamente cercanas (Gama *et al.* 2013).

En adición, en el acervo cultivado cada población parece tener su propia historia evolutiva. Las poblaciones han sido sometidas a diferentes estrategias de manejo y selección a lo largo del proceso de domesticación. Este proceso ha sido regido por diferentes objetivos y estrategias. En las diferentes poblaciones se fomentan individuos que posean características tanto morfológicas como fisiológicas deseables para productores y consumidores.

En el acervo tolerado la disminución de la diversidad ha sido atribuida al uso de herbicidas y la remoción de plantas cercanas a campos de cultivo (Zamora *et al.* en prep.). Aunado a esto, existen ciertas condiciones en las parcelas como la humedad que limitan la germinación de las semillas o la competencia con otras especies que limita el desarrollo natural de la especie (Zamora 2010). Sin embargo, es posible que se lleve a cabo la polinización y reproducción, lo que explica los altos niveles diversidad.

La diversidad genética en cada población es alta (Cuadro 4). La población cultivada CG es la más diversa ($H_e = 0.735$) mientras que la población cultivada MOR exhibe los niveles más bajos de variación ($H_e = 0.452$). Esto indica que los niveles de diversidad fluctúan más en las poblaciones cultivadas que en las toleradas o silvestres. Esto puede ser producto de una desigual intensidad de selección artificial ejercida en cada población. Por ejemplo, en la población MOR los criterios de selección son más estrictos y se promueven individuos con frutos morados. En contraste, las poblaciones cultivadas CG, CR y CO se fomentan variantes morfológicas de frutos verdes; sin embargo, se permite el desarrollo de frutos verdes con alguna tonalidad púrpura (rallados).

En contraste, las poblaciones silvestres y toleradas de *P. philadelphica* exhiben valores de diversidad genética altos y similares. La remoción de plantas por parte del hombre no parece afectar significativamente el nivel de diversidad genética en las

poblaciones estudiadas. A ésta variación pueden contribuir eventos como la mutación dentro de cada población, así como el flujo génico mediado por la polinización cruzada.

El manejo antropogénico no parece influir en la disminución de la diversidad genética en *Physalis philadelphica*. Ejemplo de ello son los valores altos registrados en los acervos tolerado y cultivado, respecto al silvestre. Esto es resultado de las prácticas de manejo, aún en zonas donde se siembra como monocultivo, es factible el intercambio y mezcla de semillas, el fomento de diversos fenotipos (color del fruto verde, morado, rallado, amarillo) o de un fenotipo particular en ciertas áreas geográficas, selección de diferentes hábitos de crecimiento (erectos, semi-erectos y postrados). Esto, aunado a la condición alógama de la especie resulta en una alta diversidad genética (Montes y Aguirre 1992, Zamora 2010).

Estructura genética

El valor de estructura genética en la comparación pareada entre las 13 poblaciones analizadas es moderadamente alta ($\theta = 0.268$). Esto, de acuerdo con la prueba de exactitud de Raymond y Rousset (1995), es estadísticamente significativo ($p < 0.05$). El valor de θ (0.268), análogo al estadístico F_{st} , es característico para plantas anuales con sistemas de polinización cruzada ($F_{st} = 0.22$) indicado por Nybom (2004). Por su parte, Zamora (2010) encontró una mayor diferenciación entre nueve poblaciones de *P. philadelphica* ($F_{st} = 0.44$) mediante el análisis de 91 loci ISSR's. Estos valores no son directamente comparables debido a las diferencias en la naturaleza y generación de los marcadores; no obstante, pueden ser producto del mayor número de loci analizados.

Los valores de diferenciación en herbáceas anuales alógamas, estimadas con SSR's son variables. Pueden ser altos, como se refiere en la maleza *Medicago laciniata* Mill. mediante el análisis de 10 poblaciones con 12 pares de cebadores microsátélites ($F_{st} = 0.477$). En esta especie, la diferenciación es atribuida al aislamiento por distancia favorecido por la amplia distancia geográfica entre sus poblaciones (Badri *et al.* 2008). Contrario a esto, la diferenciación puede ser baja, como en la especie silvestre *Papaver rhoeas* L., considerando 12 poblaciones y 11 pares de cebadores SSR's ($F_{st} = 0.04$). Esta baja diferenciación se debe al alto flujo génico entre sus poblaciones compuestas por un gran número de individuos, lo que tiende a homogenizarlas genéticamente (Kati *et al.* 2013).

En *Physalis philadelphica*, la intensidad de manejo no ha sido determinante para que entre los acervos silvestres, tolerados y cultivados exista una clara diferenciación (θ

= 0.079, $p < 0.05$); sin embargo, entre ellos, es variable. La diferenciación genética poblacional es mayor entre el acervo cultivado ($\theta = 0.293$), ligeramente menor en el silvestre ($\theta = 0.262$) e inferior para el tolerado ($\theta = 0.138$). Esta tendencia coincide con lo encontrado en *Capsicum annum*, herbácea anual alógama, donde la diferenciación en poblaciones cultivadas fue mayor ($F_{st} = 0.17$) que en las silvestres ($F_{st} = 0.06$), empleando izoenzimas (Hernández *et al.* 2006).

La mayor diferenciación genética del acervo cultivado puede ser debido a procesos históricos independientes, ocurridos dentro de cada población, mediados por el hombre y fuerzas evolutivas naturales. El origen diverso del germoplasma de *P. philadelphica*, los criterios de selección, el fomento de diferentes variantes morfológicas y en diferentes regiones geográficas, así como diferencias en la intensidad de manejo y la presencia o ausencia de intercambio de semillas han contribuido en parte a la generación y mantenimiento de la diversidad del acervo cultivado así como a su estructuración.

La selección recurrente de ciertos atributos ha llevado al desarrollo de nuevas razas o variedades locales. La región centro de Jalisco, en el occidente de México, posee la mayor producción de tomate de cáscara en el temporal de lluvias (ciclo primavera verano). En esta región se cultivan al menos tres variedades diferenciadas. La variedad Morada se generó con germoplasma del municipio de Ixtlahuacán del Río. En el municipio de Cuquío se cultiva la variedad Verde y la denominada Rallada, cuyos frutos son verdes con algunos tonos morados. Estas tres variedades tienen tamaños de fruto similares y el mismo tiempo de producción. Sin embargo, la Morada posee sabor más dulce y la Verde es más ácida, esto y el cultivarse en parcelas separadas contribuye a su diferenciación genética.

En adición, en otras áreas de México se cultivan variedades que cumplen con las preferencias locales. Ejemplo de esto son las variedades Rendidora del estado de Morelos, Salamanca del estado de Guanajuato y Diamante generada en un programa de mejoramiento genético por la Universidad Autónoma de Chapingo. Estas tres variedades, incluidas en este estudio, son de frutos verdes ácidos, grandes en Rendidora y Salamanca y muy grandes en Diamante. A su vez, presentan diferencias en el hábito de crecimiento y tiempo de madurez comercial y fisiológica (Peña *et al.* 2011). La precocidad es mayor en la Rendidora e intermedia en Salamanca y Diamante. El hábito de crecimiento es postrado en Salamanca y semi-erecto en las otras dos (Peña Lomelí *et al.* 2011). Así, el manejo de distintas variantes en diferentes regiones promueve la

diferenciación morfológica y genética de *P. philadelphica*. En adición, el intercambio o transporte de los materiales entre regiones y entre grandes áreas, a través del comercio o como semilla para cultivo contribuye a la diversificación reticulada del germoplasma de *P. philadelphica*.

El mayor porcentaje de variación encontrada, con base en el AMOVA, se concentra entre los genotipos dentro de las poblaciones (85.57 %). En una menor proporción se encuentra la variación existente entre las poblaciones (13.72 %). En paralelo, se encontró un nivel de variación genética muy bajo entre los acervos genéticos (0.71 %), evidenciado por la baja diferenciación detectada entre ellos ($\theta = 0.079$, $p < 0.05$). Lo encontrado en este análisis, aunado a los valores de diversidad genética, permite afirmar que el manejo antropogénico no ha sido determinante para que haya una clara diferenciación entre los acervos genéticos. Esto contrasta con lo encontrado en *Capsicum annum*, donde el porcentaje de variación es del 46 % dentro de las poblaciones, 36.81 % entre ellas y 17.19 % entre las categorías silvestre y cultivada (Hernández *et al.* 2006). Esto indica que en *C. annum* el proceso de domesticación si ha modificado la composición genética de sus poblaciones actuales.

El coeficiente de estructuración genética del acervo total de *Physalis philadelphica*, derivado del AMOVA, es de $\Phi_{st} = 0.144$ ($p < 0.05$). Esto indica que la distribución de la variación entre las poblaciones es baja. En esta misma especie, Vision *et al.* (2006) refieren ausencia de estructura o diferenciación en el análisis de 69 individuos, procedentes de 37 poblaciones silvestres y cultivadas, con 12 microsatélites. Contrario a esto, Zamora (2010) mediante ISSR's refiere una estructura más alta para el acervo total, pero ausencia de ella entre los acervos silvestre, tolerado y cultivado. Nybom (2004) refiere un valor de estructuración mayor, al encontrado en este estudio, para plantas alógamas analizadas con RAPD's ($\Phi_{st} = 0.27$). Otros estudios que emplean microsatélites muestran un valor de estructuración más alto ($\Phi_{st} = 0.319$) en poblaciones de *Citrullus lunatus*, una especie alógama anual de amplia distribución (Gama *et al.* 2013).

Los valores de estructura genética están estrechamente relacionados con caracteres de historia de vida y sistema de entrecruzamiento (Hamrick y Godt 1996, Nybom 2004). En plantas alógamas se ha evidenciado que el flujo génico tiende a contrarrestar la presencia de una alta estructura (Gorgonio 2012). Esto parece ocurrir a nivel del acervo total de *P. philadelphica*, como lo indican los SSR utilizados, que se caracterizan por su mayor precisión y sensibilidad. En adición, es importante remarcar

que la ausencia de estructura también se observó entre las categorías de manejo ($\Phi_{ct} = 0.007$, $p < 0.05$). Sin embargo, en este trabajo se encontró que al interior de los acervos si existe una estructura moderada a alta ($\Phi_{st} = 0.268$ en silvestres, $\Phi_{st} = 0.136$ en toleradas y $\Phi_{st} = 0.196$ en cultivadas, $p < 0.05$). Lo anterior puede ser debido a que cada población tiene su propia historia evolutiva natural y artificial acumulando cambios particulares.

Nybom (2004) señala que los parámetros F_{st} y Φ_{st} son considerados equivalentes, no obstante son diferentes. El primero se obtiene con base en el análisis de frecuencias alélicas y el segundo a partir de distancias genéticas euclidianas entre haplotipos dentro y entre poblaciones. Cuando ambos son calculados con el mismo conjunto de datos, en algunos casos, presentan valores casi idénticos. Sin embargo, no siempre ocurre esto, como se muestra en los resultados obtenidos en este estudio.

El intervalo de valores de identidad y distancia genética muestran que el acervo de *P. philadelphica* es diverso. Esto queda evidenciado en el rango de valores que presentan estos parámetros. Las distancias genéticas van desde 0.314 (CUA-UT) hasta 2.842 (AGS-REN). En el acervo cultivado, sus poblaciones presentan las mayores distancias genéticas con el resto de las poblaciones, como en la población SAL ($D = > 1.351$ y hasta 2.453) y DIA ($D = > 1.040$ y hasta 1.820). A su vez, pueden presentar distancias bajas con cultivadas de su misma región, como las poblaciones MOR y CG ($D = 0.415$), CO-CR ($D = 0.741$) o distancias un poco mayores como en MOR-CR ($D = 0.981$) y MOR-CO ($D = 1.504$). La población REN exhibe los valores más fluctuantes de distancias genéticas. Estas pueden ser altas respecto a las otras poblaciones cultivadas ($D = 1.516$ a 2.147) y con la silvestre AGS ($D = 2.842$) o un poco menores con algunas toleradas y silvestres ($D = 0.863$ a 1.212). Existe una tendencia al incremento de la distancia genética entre las poblaciones cultivadas en áreas geográficas distantes y una distancia moderada o menor entre las poblaciones cultivadas dentro de una misma región, así como con algunas toleradas de esa área.

Las poblaciones del acervo tolerado y silvestre también exhiben un patrón similar de variación en las distancias genéticas. En general las poblaciones silvestres tienden a presentar las mayores distancias con los otros acervos, particularmente con el cultivado. No obstante, con algunas toleradas o cultivadas pueden tener una menor distancia, por ejemplo la silvestre ZAP presenta bajas distancias con las cultivadas de su misma región (CO, CR, CG, MOR, $D = 0.619$ a 0.977). Por su parte, las poblaciones del acervo tolerado presentan la mayor distancia con algunas silvestres, exhiben baja

distancias genéticas entre ellas ($D = 0.314$ a 0.389) y con la población cultivada MOR ($D = 0.315$ a 0.385).

El fenograma no muestra un claro agrupamiento de las poblaciones con base en el acervo genético al que han sido asignadas (Figura 2). Sin embargo, algunas de ellas tienden a agruparse con las que se encuentran geográficamente más cercanas. Ejemplo de esto es lo que sucede en el subgrupo IIA que incluye a las tres poblaciones toleradas, las poblaciones cultivadas CG, MOR y REN y la silvestre ZAP. El subgrupo IIB está formado solo por la población silvestre de VAL. Por último el subgrupo IIC se conforma por las poblaciones cultivadas CR y CO y la silvestre de AGS. Lo anterior muestra también que no todos los grupos tienden a agruparse con base en la distancia geográfica.

Las poblaciones con distancias genéticas menores o cercanamente relacionadas en el fenograma pueden corresponder a poblaciones con un ancestro común más reciente. Según Demarchi (2009) esta división supone que las frecuencias alélicas son idénticas a la población de origen. Sin embargo, éstas son afectadas por el equilibrio entre flujo y deriva génica, distribución geográfica, tamaño efectivo o cuellos de botella. Estos pueden llevar a una tasa de evolución variable en cada población, aunque la tasa de mutación siga siendo la misma, por lo que la diversidad genética tiene un gran impacto en las distancias genéticas.

El análisis bayesiano de asignación de individuos, muestra la existencia de 12 grupos genéticos dentro de las 13 poblaciones analizadas (Fig. 4). Cuatro poblaciones, las cultivadas DIA, REN y SAL y la silvestre AGS se comportan como grupos genéticos independientes, sin flujo génico reciente con el resto de las poblaciones (Figura 5). Esto es consistente con los bajos valores de identidad y altos de distancia genética observados en la comparación pareada de estas poblaciones con las otras nueve (Cuadro 6). Otras cinco exhiben una tendencia similar, las silvestres VAL y ZAP, la tolerada YAH y las cultivadas CR y CG, se componen en un alto porcentaje (desde 83 hasta 99 %) por haplotipos de individuos de su misma población. Esto sugiere escaso flujo génico reciente entre poblaciones con distinto grado de manejo. Por el contrario, tres grupos genéticos (YAH, CG, ZAP) se constituyen por poblaciones que comparten moderados a altos niveles de ancestría con una o dos poblaciones. En el caso de la tolerada YAH y la cultivada CG comparten ancestría con la tolerada UT ($q=0.249$ y 0.568 respectivamente); no obstante YAH tiene un valor mayor de pertenencia a su propia población ($q = 0.70$) que CG ($q = 0.354$). En adición YAH tiene ancestría con las

cultivadas CO y CG ($q=0.016$ y 0.026 , respectivamente) y para la silvestre ZAP también se observó flujo génico con la cultivada CO ($q = 0.323$). Lo anterior indica la existencia de flujo génico entre las poblaciones silvestres, toleradas y cultivadas de *P. philadelphia* ubicadas en una misma región, en este caso Jalisco y es consistente con la topología mostrada en el análisis de agrupamiento (Figura 2). Por último, la población tolerada CUA comparte haplotipos con la cultivada MOR y la tolerada UT ($q=0.654$ y 0.335 , respectivamente), ambas de Jalisco, por lo que no forma un grupo genético independiente (Cuadro 7 y Figura 5). La formación de estos grupos genéticos es reflejo de procesos históricos, de distribución espacial y temporal de las poblaciones, distancia entre ellas y barreras antropogénicas o naturales que contribuyen a la estructuración y evolución de las poblaciones de *P. philadelphia* (Freeland 2005, Garrido-Garduño 2013). En *P. philadelphia*, el flujo génico reciente entre sus poblaciones parece estar relacionado con el espacio geográfico que las separa.

CONCLUSIONES

El acervo de *Physalis philadelphica* posee alta diversidad genética y no hay evidencia de que el manejo humano haya causado una disminución de la misma. Los niveles de variación genética no presentan una relación con la intensidad de manejo antropogénico, contrario a lo esperado, por categoría de manejo los valores más altos de diversidad se concentran entre las poblaciones cultivadas, seguidas de las silvestres y por último en las toleradas. A nivel de la especie su estructura genética es moderada y baja entre acervos, lo que indica un bajo efecto del manejo humano en la diferenciación. *Physalis philadelphica* es una alógama anual, de amplia distribución, lo que aunado al intercambio de semillas entre los productores de poblaciones cultivadas podrían ser los que expliquen su alta diversidad y moderada estructura genética. Esta alta diversidad genética es evidencia por la una amplia riqueza morfológica que posee el acervo y reconocida en siete razas, dentro de las cuales se incluyen variedades locales o criollas cultivadas a lo largo del país y la raza milpero que representa a las poblaciones arvenses. Futuros estudios en tomate de cáscara podrían continuar con la evaluación de diversidad y estructura genética incluyendo un mayor número de poblaciones representativas del área total de su distribución y todas las razas del acervo; con el fin de contar con información que pueda ser utilizada en un programa de conservación y manejo del germoplasma. De manera paralela, se ha señalado que el cambio morfológico de las variedades de una especie descansa en una base genética muy angosta que involucra a pocos genes, por tanto resulta primordial desarrollar estudios sobre a arquitectura genética de la domesticación en *P. philadelphica*.

LITERATURA CITADA

- Adamson N. L. 2011. An assessment of non-Apis bees as fruit and vegetable crop pollinators in Southwest Virginia. Tesis de doctorado. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, EUA. 147pp.
- Azofeifa Delgado A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-241.
- Badri M., A. Zitoun, H. Ilahi y M. E. Aouani. 2008. Morphological and microsatellite diversity associated with ecological factors in natural populations of *Medicago laciniata* Mill. (Fabaceae). *Journal of Genetics* 87: 241–255.
- Balloux F. y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.
- Beebee T. y G. Rowe. 2001. Application of genetic bottleneck testing to the investigation of amphibian declines: a case study with natterjack toads. *Conservation Biology* 15: 266-270.
- Bock M. A., J. Sánchez-Pilcher, L. J. McKee y M. Ortiz. 1995. Selected nutritional and quality analyses of tomatillos (*Physalis ixocarpa*). *Plant Foods Human Nutrition* 48: 127-133.
- Buso G. S. C., Z. P. S. Amaral, R. P. V. Brondani y M. E. Ferreira. 2006. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology Notes* 6: 252-254.
- Callen E. O. 1967. Analyses of the Tehuacan coprolites. Pp. 261-269, en Bayer D. S. (Ed.). *The prehistory of the Tehuacan Valley, 1. Environment and subsistence.* University of Texas Press, Austin, Texas, E. U. A.
- Child A. y R. N. Lester. 1991. Life form and branching within the Solanaceae. Pp. 151-159, en Hawkes J. G., R. N. Lester, M. Nee y N. Estrada-R (eds.). *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution.* Royal Botanical Gardens Kew. Great Britain.
- Cipollini M. L., D. J. Levey. 1997. Secondary metabolites of fleshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *American Naturalist* 150: 346-372.
- Contreras-Toledo A. R., H. López-Sánchez, A. Santacruz-Varela, E. Valadez-Moctezuma, V. H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres y P. A. López. 2011.

- Diversidad genética en México de variedades nativas de chile poblano mediante microsatélites. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34: 225-232.
- Cuevas-Arias C., O. Vargas y A. Rodríguez. 2008. Solanaceae diversity in the state of Jalisco, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79: 67-79.
- Cunha C. P., E. S. S. Hoogerheide, M. I. Zucchi, M. Monteiro y J. B. Pinheiro. 2012. New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* (Alliaceae). *American Journal of Botany* e17–e19.
- Desplanque B., P. Boudry, K. Broomberg, P. Saumitou-Laprade, J. Cuguen y H. Van Dijk. 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1194-1201.
- Demarchi D. A. 2009. Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica* 11: 73-88.
- Díaz-Guillén F. 2010. El proceso de domesticación en plantas. *Casa del Tiempo* 3: 66-70.
- Doebley J. F., B. S. Gaut y B. D. Smith. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1327.
- Doyle J. y J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Earl D. A. y B. M. vonHoldt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Espinosa K., Bonilla M., Muñoz J. E., Posso A. M. y Vásquez, H. 2004. Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva *Physalis peruviana*. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 2: 72-78.
- Evanno G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier, L., P. Smouse y J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479 -491.
- Excoffier L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies; an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Freeland J. R. 2007. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. Inglaterra. 388 pp.
- Freeman S. y J. C. Herron. 2002. *Análisis Evolutivo*. Pearson Educación. Madrid, España. 720 pp.
- Gama R. N. C. S., C. A. F. Santos y R. C. S. Dias. 2013. Genetic variability of watermelon accessions based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 12: 747-754.
- Garrido-Garduño T. y E. Vázquez-Domínguez. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 1031-1054.
- Ghneim-Herrera T., D. Posso-Duque, I. Pérez-Almeida, G. Torrealba-Núñez, A. J. Pieters, C. P. Martínez y J. M. Tohme. 2008. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 11: 1-14.
- Godoy J. A. y P. Jordano. 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Molecular Ecology* 10: 2275-2283.
- Golubov J. y J. Ortega. 2007. Los análisis de paternidad, ¿para qué nos sirven? Pp. 163-181, en Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Comps.). *Ecología molecular*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. D.F. México.
- Gómez Camacho R., M. N. Rodríguez Mendoza, E. Cárdenas-Soriano, M. Sandoval-Villa y M. T. Colinas de León. 2006. Fertilización foliar con silicio como alternativa contra la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* (Sheld) en tomate de cáscara. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 12: 69-75.
- González E. G. 2003. Microsatélites y sus implicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59: 377-388.
- Gorgonio Ramírez M. 2012. Variabilidad y estructura genética de *Quercus eduardii* (Fagaceae) en Sierra Fría, Aguascalientes. Tesis de licenciatura. Universidad de la Sierra de Juárez. 84 pp.

- Groombridge J. J., C. G. Jonest, M. W. Bruford, y R. A. Nichols. 2000. Ghost alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* 403: 616-617.
- Hamrick J. L. y M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 351: 1291-1298.
- Hernández-Verdugo S., A. González-Rodríguez, P. Sánchez-Peña, A. Casas y K. Omayá. 2006. Estructura y diferenciación genética de poblaciones silvestres y domesticadas de chile del noreste de México analizadas con isoenzimas y RAPD's. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29: 25-29.
- Hudson W. D. 1986. Relationships of domesticated and wild *Physalis philadelphica*. Pp 416-432, en: D'Arcy, W. G. (ed) *Solanaceae: biology and systematics*. Columbia University Press, New York.
- Kati V., V. Le Corre, S. Michel., L. Jaffrelo., C. Poncet y C. Délye. 2013. Isolation and characterisation of 11 polymorphic microsatellite markers in *Papaver rhoeas* L. (Corn Poppy), a major annual plant species from cultivated areas. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 470-479.
- Klug W. S., M. R. Cummings y C. A. Spencer. 2006. *Conceptos de Genética*. Pearson Educación. Madrid, España. 920 pp.
- Lagos T. C., C. M. Caetano, F. Alirio Vallejo, J. E. Muñoz, H. Criollo y C. Olaya. 2005. Caracterización palinológica y viabilidad polínica de *Physalis peruviana* Lam. y *Physalis philadelphica* Lam. *Agronomía Colombiana* 23: 55-61.
- Lamprea N., L. López, D. Santacruz, J. Guerrero y C. Burbano. 2004. Modificaciones técnicas en el uso de microsatélites y AFLP para el estudio poblacional de diversas especies de peces en el río Sinú, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6: 72-78.
- Long T. J. 1985. De tomates y jitomates en el siglo XVI. *Estudios de Cultura Náhuatl* 239-252.
- Long T. J. 2001. Una semblanza de las Solanaceae. *Etnobiología* 1: 18-24.
- Mac Neish, R. S. 1966. A summary of the subsistence. Pp. 290-309, en D.S. Byers (ed.). *The prehistory of the Tehuacan Valley, 1. Environment and subsistence*. University of Texas Press. Austin, Texas. USA.
- Magdaleno-Villar J. J., A. Peña-Lomelí, R. Castro-Brindis, A. M. Castillo-González, A. Galavis-Spinola, F. Ramírez-Pérez y B. Hernández-Hernández. 2006a. Efecto de

- soluciones nutritivas sobre el desarrollo de plántulas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo, Serie Horticultura 12: 223-229.
- Magdaleno-Villar J. J., A. Peña-Lomelí, R. Castro-Brindis, A. M. Castillo-González, A. Galavis-Spinola, F. Ramírez-Pérez y P. A. Becerra-López. 2006b. Efecto de tres sustratos y dos colores de plástico en el desarrollo de plántulas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo, Serie Horticultura 12: 153-158.
- Martin A. C., H. S. Zim, A. L. Nelson. 1961. American Wildlife & Plants. Dover: New York, pp 414-415.
- Martínez M. 1998. Revision of *Physalis* section Epeteiorhiza (Solanaceae). Anales de Instituto de Biología. Serie Botánica 69: 71-117.
- Martínez-Oceguera J. M., R. Gutiérrez-Campos y E. García-Pineda. 2006. Transformación de plantas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot. Var. rendidora) con el gen OC-I (orizacistatina I). Revista Mexicana de Fitopatología 24: 13-19.
- McClung de Tapia E. 1977. Recientes estudios paleoetnobotánicos en Teotihuacán, México. Anales de Antropología 14: 49-61.
- Miller M. P. 2000. Tools for population genetic analysis (TFPGA). Ver 1.3. Northern Arizona University. Arizona, E. U. A.
- Montes-Hernández S. 1991. Tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.). Avance en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. Pp. 251-259, en Ortega P., R, G. Palomino H., F. Castillo G., V. A. González H. y M. Livera M. (Eds). Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética.
- Montes-Hernández S. y A. R. Aguirre-Rivera. 1992. Etnobotánica del tomate (*Physalis philadelphica* Lam.). Mesa de Recursos Fitogenéticos, Memorias de la XXXVII Reunión Anual.
- Montes Hernández S. y A. R. Aguirre Rivera. 1994. Etnobotánica del tomate mexicano (*Physalis philadelphica* Lam.). Revista de Geografía Agrícola 20:163-172.
- Montes Hernández S., J. R. Aguirre Rivera, E. García Moya y F. V. González Cossío. 1991. Algunos efectos de la domesticación sobre la morfología del tomate. Agrociencia serie Fitotecnia 2: 7-26.

- Moreno Letelier A. 2007. Tamaño efectivo de la población. Pp. 63-86, en Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Comps.). Ecología molecular. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. D.F. México.
- Moreno Maldonado M., A. Peña Lomelí, J. Sahagún Castellanos, J. E. Rodríguez Pérez y R. Mora Aguilar. 2002. Varianza aditiva, heredabilidad y correlaciones en la variedad M1-Fitotecnia de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Fitotecnia Mexicana 25: 231- 237.
- Nee M. 1986. Solanaceae I. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz. 49:1-191.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 238-292.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology 13: 1143-1155.
- Pandey K. K. 1957. Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brat.- A new system. Amer. J. Bot 44: 879-887.
- Peña Lomelí A. 2001. Situación Actual y Perspectivas de la Producción y Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. Primer Simposio Nacional. Técnicas modernas de producción de tomate, papa y otras solanáceas. Universidad Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. 10 p.
- Peña Lomelí A, J. F. Santiaguillo Hernández y N. Magaña. 2007. Recursos y mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Pp. 31-71 en Bautista M. y P. C. Chavarín (eds.). Producción de tomate de cáscara. Colegio de Postgraduados. Estado de México, México.
- Peña Lomelí A., J. D. Molina Galán, J. Sahagún Castellanos, J. Ortiz Cereceres, F. Márquez Sánchez, T. Cervantes Santana y J. F. Santiaguillo Hernández. 2008. Parámetros genéticos en la variedad CHF1 Chapingo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo, Serie Horticultura 14:5-11.
- Peña Lomelí A., N. Magaña Lira, S. Montes Hernández, J. Sánchez Martínez, J. F. Santiaguillo Hernández, O. Grimaldo Juárez y A. Rodríguez Contreras. 2011. Manual Gráfico para la Descripción Varietal de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. Ex Horm). SNICS-SAGARPA, Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, México. 90 pp.

- Pérez Camacho I., V. A. González Hernández, O. J. Ayala Garay, J. A. Carrillo Salazar, G. García de los Santos, A. Peña Lomelí y E. Cruz Crespo. 2012. Calidad fisiológica de semillas de *Physalis ixocarpa* en función de madurez de cosecha y condiciones de almacenamiento. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 67-78.
- Pérez Moreno L. y J. Granados Avilés. 2001. Fertilización nitro-fosfórica en tomate de cáscara *Physalis ixocarpa* Brot. de riego, en Irapuato, Gto., México. *Acta Universitaria* 11: 19-25.
- Pickergill B. 2007. Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany* 100: 925-940.
- Ponce Valerio J. J., A. Peña Lomelí, J. E. Rodríguez Pérez, R. Mora Aguilar, R. Castro Brindis y N. Magaña Lira. 2012. Densidad y poda en tres variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) cultivado en invernadero. *Rev Chapingo Ser Hortic.* 18: 325-332.
- Ponciano Samayoa K. M., J. C. Villatoro Mérida y L. G. Molina Monterroso. 2009. Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de frijol común trepadora. *Agronomía Mesoamericana* 20: 245-254.
- Pritchard J. K., X. Wen y D. Falush. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. University of Chicago. E. U. A.
- Purugganan M. D. y D. Q. Fuller. 2009. The nature of selection during plant domestication. *Nature* 457: 843-848.
- Rahman M. H., B. Jaquish y P. D. Khasa. 2000. Optimization of PCR Protocol in Microsatellite Analysis with Silver and SYBR[®] Stains. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 339-348.
- Raymond M. L. y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Rentería Alcántara M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. Pp. 541-566, en Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Comps.). *Ecología molecular*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. D.F. México.
- Ríasco J. J., J. I. Victoria y F. Ángel. 2003. Diversidad genética en variedades de cañas de azúcar (*Saccharum* spp.) usando marcadores moleculares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 6-15.

- Ribeiro Trindade A. P., R. J. Barth Pinto, A. Teixeira do Amaral Júnior, C. A. Mangolín, M. F. Pires da Silva Machado y C. A. Scapin. 2010. Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: 1-9.
- Rivera Madrid R., L. E. Garza Caligaris y E. Rincón. 1989. Algunos aspectos de la ecofisiología de la germinación en *Physalis philadelphica*. *Acta Botánica Mexicana* 7: 33-41.
- Sánchez Martínez J., J. M. Padilla, B. A. Bojórquez, Ma. C. Arriaga, L. J. Arellano, E. Sandoval y I. E. Sánchez. 2006. Tomate de cáscara cultivado y silvestre del occidente de México. SAGARPA, SNICS y Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Producción Agrícola. Impresión Publicitaria Prometeo Editores. Guadalajara, Jalisco, México. 176 pp.
- Santiaguillo Hernández J. F. y S. Blas Yáñez. 2009. Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía Agrícola* 43: 81-86.
- Sanguinetti C, J. E. Dias Neto y A. J. G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.
- SIAP. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/> (Acceso: 25 de agosto de 2012).
- Sullivan J. R. 1985. Systematics of the *Physalis viscosa* complex. *Syst Bot* 10: 426-444.
- Valdés-Infante Herrero J., N. N. Rodríguez Medina, M. Bautista Alor, M. M. Ortiz García, A. Quiroz Moreno, L. F. Sánchez Teller, A. M. Risterucci y W. Rohde. 2010. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12: 64-76.
- Vargas Ponce O., M. Martínez y Díaz y P. Dávila Aranda. 2003. La familia Solanaceae en Jalisco –El género *Physalis*-. Universidad de Guadalajara. Guadalajara. México. 126 pp.
- Vision T. J., M. I. Chacon, M. Tsompana, L. Robertson, A. Peña Lomelí y O. Vargas. 2006. Microsatellite variation and population structure in tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.). 90th Annual Meeting of the Potato Assosiation of America,

VI International Solanaceae Conference, Solanaceae Genomics Network.
Madison Wisconsin.

- Waterfall U. T. 1956. A taxonomic study of the genus *Physalis* in North America North of México. Tesis de Doctorado. The University of Oklahoma. Graduate College. 127pp.
- Weir B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yeh F., R. C. Yang y J.T. Boyle. 1999. Popgene version 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmondton, Canada.
- Zamora Tavares M. P. 2010. Evaluación de la diversidad genética del tomate de cáscara *Physalis philadelphica* Lam. (Solanaceae). Tesis de Licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. 47pp.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN en plantas (Doyle & Doyle 1987)

1. Moler el tejido (100-500 mg) con nitrógeno líquido, en un mortero (previamente enfriado a -20°) hasta obtener un polvo fino. Transferir la muestra con una espátula a un tubo de 2 ml, agregar 800 μ l del Buffer de extracción CTAB 2X (incubado previamente a 60°) y mezclar suavemente. Alternativamente se puede agregar el tejido en tubo de 2 ml y sumergirlo en un mortero con nitrógeno líquido, moler el tejido con varilla de acrílico.
2. Incubar la muestra a 60° por 60 minutos en baño maría, agitar cada 20 minutos.
3. Sacar y dejar que los tubos tomen la temperatura ambiente (5-7 min).
4. Añadir 800 μ l de la mezcla cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar por inversión durante 5 min (puede ser con la misma punta, siempre y cuando no toque el tubo).
5. Centrifugar por 30 minutos a 4,500 o 5,000 rpm.
6. Recuperar el sobrenadante que contiene el ADN y transferirlo a otro tubo de 1.5 ml con pipeta de 200 μ l; cuantas veces se necesite para extraer lo más posible de sobrenadante.
7. Agregar 700 μ l de isopropanol frío y mezclar por inversión suavemente hasta obtener la hebra de ADN (si no se obtiene hebra, centrifuga por 2 min a 2.000 rpm). Nota: se puede pausar el protocolo en este punto y dejar la muestra a -20° hasta el día siguiente.
8. Transferir la hebra de ADN a otro tubo de 1.5 ml o centrifugar por 1-2 min a 2,500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
9. Añadir 500 μ l de buffer de lavado frío e invertir suavemente, previamente desprender la pastilla. Mantener así por 20 min. Eliminar el buffer de lavado con la pipeta de 1,000 μ l o centrifugar a baja velocidad (2,500 rpm por 2 min).
10. Secar con aire por tiempo corto y resuspender en 200 μ l de Buffer TE. Asegúrese de disolver preferentemente el ADN (sostener el tubo y golpear suavemente con la yema del dedo).
11. Añadir 70 μ l de agua HPLC y 130 μ l de acetato de amonio 7,5M (c.c. final 2.5M) y mezclar suavemente (sostener el tubo y golpear con la yema del dedo).
12. Añadir 850 μ l de etanol absoluto frío, inmediatamente mezclar para precipitar el ADN (use una gradilla flexible).
13. Recuperar la hebra o centrifugar por 5 min a 4,500 rpm. Decantar.
14. Lavar con 1 ml de etanol al 70 % y mezclar suavemente 5 min. Centrifugar por 2 min a 2,500 rpm. Decantar el etanol (repetir este paso 2 veces, solo si la hebra presenta color amarillento).
15. Añadir 80 μ l de Buffer TE para resuspender el ADN. Mezclar suavemente hasta que se disuelva la pastilla. Si no se disuelve se agrega 100-150 μ l. Disolver durante toda la noche a temperatura ambiente.
16. Almacenar el ADN genómico obtenido en congelación a -20° hasta su uso.

Anexo 2. Preparación y almacenamiento de reactivos para extracción

Buffer de extracción CTAB 2X:

1000 µl de CTAB 2X por c/muestra.

2 µl de 2-mercapto-etanol ($\text{CH}_2\text{H}_6\text{OS}$) por c/muestra.

Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1 (100 ml)

96 ml Cloroformo

4 ml Alcohol isoamílico

Mezclar perfectamente y almacenar -20° .

Isopropanol frío

Mantener almacenado a -20° .

Buffer de Lavado

76 ml Etanol absoluto

133 µl Acetato de amonio 7.5 M

Ajustar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a -20° .

Buffer de resuspensión TE

1 ml Tris 1M pH 7.4 c.c. final 10 mM

200 µl EDTA 0.5 M c.c. final 1 mM

70 ml Agua Destilada

Ajustar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4° .

Buffer CTAB 2X

2 g CTAB

70 ml Agua destilada

Disolver completamente, añadiendo poco a poco el agua en la plancha y agitando con imán después añadir:

10 ml Tris 1M pH 8

4 ml EDTA 0.5M

8.18 g NaCl

Ajustar a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado. Almacenar a temperatura ambiente.

Tris 1M

12.11 g Trisma base

60 ml Agua destilada

Ajustar el pH con HCl absoluto. Usar la campana de flujo para tomar el HCl necesario.

Importante: Para pH 8 añadir aprox. 6 ml de HCl y para pH 7.4 añadir aprox. 7.6 ml de HCl. Ajustar a 100 ml en un matraz aforado. Almacenar a 4° .

EDTA 0.5 M pH8

18.6 g EDTA

70 ml Agua destilada

Ajustar a pH 8 con aprox. 1-2 g de NaOH. Llevar a 100 ml con agua destilada.

Almacenar a 4° .

Importante: Solo se disuelve el EDTA cuando se le añade el NaOH.

Anexo 3. Programa de amplificación utilizado para las PCR

94° 5 minutos
94° 30 segundos
Tm° 1 minuto } 35 ciclos
72° 2 minutos
72° 5 minutos
4° 24 horas

- Tm° de los cebadores SSR130, SSR140 y MIC341: 55°.
- Tm° de los cebadores MIC3, MIC43 y SSR301: 56.5°.

Anexo 4. Preparación de solución de poliacrilamida

Solución base de Acrilamida (19:1) 40 %

Acrilamida 38 g
Bis-acrilamida 2 g
Agua bidestilada 50 ml
Disolver y aforar a 100 ml

Poliacrilamida 6 % Urea 7M

Stock Poliacrilamida 40 % 15 ml
10X TBE 10 ml
Urea 42 g
Agua bidestilada 30 ml

Se precalienta el TBE y el agua a 50° y se agrega poco a poco la urea hasta que se disuelva, se agrega la solución base de poliacrilamida y se afora a 100 ml.

Polimerización de los geles de acrilamida

Compuesto	Cantidad			
Poliacrilamida 6 %	30 ml	40ml	60 ml	100 ml
Persulfato de amonio	120 µl	160 µl	240 µl	400 µl
TEMED	60 µl	80 µl	120 µl	200 µl

Anexo 5. Tinción con sales de plata (Sanguinetti 1994)

Solución reveladora

Compuesto	Cantidad
Hidróxido de sodio	30 g
Formaldehído	13.5 ml
H ₂ O dd	Aforar a 1 l

Solución fijadora

Compuesto	Cantidad
Etanol	10 ml
Ácido acético glacial	5 ml
H ₂ O dd	Aforar a 1 l

Procedimiento:

1. Poner el gel en solución fijadora 10 minutos.
2. Decantar la solución fijadora.
3. Agregar la solución de nitrato de plata y dejar 5 minutos.
4. Decantar.
5. Lavar con agua destilada por 30 segundos.
6. Agregar la solución reveladora hasta aparición de bandas.
7. Enjuagar con agua corriente.