

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



Evaluación de la diversidad genética de *Physalis angulata* L. (Solanaceae)

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JUDITH DEL CARMEN MORALES SAAVEDRA

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre de 2014



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JUDITH DEL CARMEN MORALES SAAVEDRA
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: "**Evaluación de la diversidad genética de *Physalis angulata* L. (Solanaceae)**", para obtener la Licenciatura en Biología.

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

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

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

"Año del Centenario de la Escuela Preparatoria de Jalisco"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 22 de septiembre de 2014

DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ
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: "Evaluación de la diversidad genética de *Physalis angulata* L. (Solanaceae)." que realizó la pasante Judith del Carmen Morales Saavedra con número de código 209238034 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.



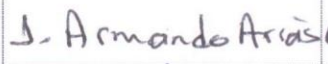

Atentamente
 Zapopan, Jalisco, 13 de noviembre de 2014



Ofelia Vargas Ponce
 Directora del trabajo

COMITE DE
 TITULACION



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Miguel Ángel Macías Rodríguez		14 / NOVIEMBRE / 2014
Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula		17 / NOV / 2014
Dr. José Armando Arias García		21 / NOV / 14
Supl. Dra. Georgina Vargas Amado		14 - Nov / 2014



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

“El hombre es la especie más demencial de todas. Adora a un Dios invisible y masacra a la Naturaleza tan visible.... sin darse cuenta de que esta Naturaleza que masacra es ese Dios invisible al que adora”

Hubert Reeves

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ofelia Vargas Ponce, por su gran apoyo, disposición, transmisión de conocimientos, confianza y paciencia para la realización de este trabajo.

A mis sinodales Dr. Miguel Ángel Macías Rodríguez, Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula, Dr. Armando Arias García y Dra. Georgina Vargas por la revisión del trabajo y sus observaciones para mejorarlo. Al Dr. Miguel Ángel Macías Rodríguez por el apoyo, la confianza y amistad brindada durante mi formación académica, lo que hizo para ayudarme jamás lo olvidaré.

Al Dr. Aarón Rodríguez por permitirme trabajar en el laboratorio que está a su cargo y por su peculiar forma de transmitir entusiasmo por el trabajo con plantas. A la Dra. Lucila Méndez Morán a la que debo mi gusto por la biología molecular y el trabajo en laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio y del herbario a los que les debo tantas horas de trabajo, diversión y convivencia, Luis Villa, Isaac Sandoval, Arturo Castro, Jesús Rodríguez, Dánae Cabrera, Ernesto de Castro, Gina Vargas, Guadalupe Munguía y Pilar Zamora, a la que debo mi adiestramiento en el arte de los geles de poliacrilamida y agradezco infinitamente por su apoyo personal en tiempos difíciles. A las paganas fest's por permitirme liberar la tensión de fines de semestre y prepararme para la siguiente ronda.

A mis padres, por su apoyo y motivación, gracias a ellos pude llegar a culminar esta etapa de mi vida, los amo. A mis hermanos, Andrés, Oscar, Juan Francisco y Edgar a los que quiero tanto y admiro porque de cada uno he aprendido mucho. A la lucecita que llegó a iluminar mi vida y la de toda mi familia, Amany.

A mi amigo Marcos por su amistad y apoyo incondicional, quisiera que hubiera más personas como él. A Jarumy y a Kris por irme a visitar al laboratorio y distraerme un rato.

A la familia Lomelí Díaz, en especial a Carlos, Karen y Luisao† por su gran apoyo para ingresar a la carrera.

A la familia Sánchez Hernández por brindarme un hogar en la etapa final y más difícil del trabajo.

A Adhaly..... por aceptar compartir su vida conmigo, por ser mi más grande apoyo y motivación, gracias por estar.....

Resumen

Physalis angulata L. (Solanaceae) es una herbácea anual de importancia culinaria y económica en el occidente de México. En condición silvestre crece en el bosque tropical caducifolio, bosque de pino-encino, frecuente a orillas de ríos, y asociada a cultivos. Es una arvense común en el cultivo de la milpa y otros agroecosistemas. En ésta región es un recurso de recolección, los frutos se conocen como tomate milpero, tienen alta preferencia de consumo por su sabor y tamaño pequeño. Recientemente, se reportó su cultivo en el municipio de Cuquío en Jalisco. Debido a que la selección y manejo humano pueden causar cambios en la composición, la diversidad y la estructura genética de las poblaciones, resulta relevante evaluar su efecto en un cultivo incipiente. En este trabajo, se evaluó la diversidad genética de *P. angulata* en poblaciones arvenses y cultivadas, así como su estructura y relaciones genéticas. Para ello, se utilizaron 88 marcadores ISSR y se analizaron 239 individuos de 11 poblaciones, 8 de ellas arvenses y 3 cultivadas. Como resultado se encontró que la especie presenta niveles altos de diversidad, medida como heterocigocidad esperada ($HT=0.247$) y loci polimórficos ($P= 100\%$). Las poblaciones cultivadas presentan valores altos de diversidad ($He=0.153$ a 0.146), ligeramente menores que los observados en poblaciones arvenses de recolección ($He= 0.223$ a 0.1353). Es posible que éstas poblaciones contengan el acervo genético regional, que hayan sido integradas por frutos de varias poblaciones. No obstante, *Physalis angulata* no muestra una disminución significativa en la diversidad genética de las poblaciones cultivadas, debido a que el proceso de domesticación es incipiente y al manejo tradicional del cultivo. La diferenciación genética entre las poblaciones es alta ($Fst = 0.418$). Este valor se ve fuertemente influenciado por el sistema autocompatible de la especie. Entre poblaciones cultivadas y arvenses el valor de diferenciación fue bajo ($Fst = 0.077$); esto confirma que el impacto del manejo no se ha reflejado y las poblaciones mantienen cierta homogeneidad genética. En conjunto, las poblaciones cultivadas muestran un ligero aumento en el valor de diferenciación con respecto a las arvenses ($Fst = 0.484$ y 0.405). La diferencia entre estos valores no es significativa, gracias al manejo rústico de su cultivo y a la poca

intensidad de selección a la que ha sido sometido. Las relaciones genéticas, medidas con un índice de distancia, no se relacionan con las condiciones de manejo ni con las distancias geográficas. Las poblaciones con las distancias genéticas más cercanas fueron CUQJ de Jalisco y PAJ de Michoacán. La cercanía genética de estas especies a pesar de estar ubicadas en diferentes estados, es explicada por un posible corredor de intercambio de semillas en el centro de comercialización que los separa geográficamente.

INDICE

INDICE DE CUADROS	IV
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE ANEXOS	V
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	6
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Material estudiado.....	9
Extracción de ADN, generación y visualización de marcadores ISSR.....	11
Análisis de datos.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	26
REFERENCIAS.....	27

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Información de las poblaciones de <i>Physalis angulata</i> estudiadas.....	9
Cuadro 2.	Secuencia de los iniciadores ISSR, temperatura de alineación, bandas generadas y tamaño en pb (pares de bases) usados en el estudio de <i>Physalis angulata</i>	11
Cuadro 3.	Diversidad genética de <i>Physalis angulata</i> . A) Por población B) por condición (arvenses y cultivadas y C) por acervo.....	15
Cuadro 4.	Estimadores de diferenciación genética. <i>Fst</i> de Wrigth's (1951) y su análogo el estimador Bayesiano θ_B de Holsinger (1999).....	16
Cuadro 5.	Valores de diferenciación genética mediante análisis AMOVA de Excoffier <i>et al.</i> (1992).....	17
Cuadro 6.	Valores de Φ_{PT} entre pares de poblaciones de <i>Physalis angulata</i>	17
Cuadro 7.	Matriz de distancias genéticas de Nei (1978) entre las 11 poblaciones de <i>Physalis angulata</i> estudiadas.....	18

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación de las poblaciones de <i>Physalis angulata</i> estudiadas.....	10
Figura 2.	Patrón de bandeo obtenido con los tres iniciadores ISSR en <i>Physalis angulata</i> en geles de poliacrilamida.....	14
Figura 3.	Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre las poblaciones de <i>Physalis angulata</i> estudiadas.....	19

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Protocolo para la extracción de ADN en plantas (Doyle & Doyle).....	34
Anexo 2.	Preparación de reactivos para extracción de ADN.....	36
Anexo 3.	Preparación de solución de poliacrilamida.....	38
Anexo 4.	Tinción con sales de plata (Sanguinetti 1994).....	39

Introducción

Solanaceae Juss. es una de las familias más grandes dentro de las angiospermas, con 96 géneros y aproximadamente 2,300 especies. Su distribución es cosmopolita aunque se le encuentra con mayor frecuencia en regiones tropicales, subtropicales y templadas (D'Arcy 1991). México es un centro secundario de diversificación de Solanaceae, representado por aproximadamente 386 especies (Rodríguez 2004, Martínez *et al.* 2011). Chiapas es el estado más rico en especies con 180, seguido de Oaxaca con 176 y Jalisco con 149 (Martínez *et al.* 2011). México también es rico en endemismos, alberga 123 especies endémicas, 40 del género *Solanum* L., 35 de *Physalis* L., 16 de *Cestrum* L. y 10 de *Lycianthes* (Dunal) Hassl. Para el estado de Jalisco se reportan cinco especies endémicas, *Lycianthes jalicensis* E. Dean, *Physalis lignescens* Waterf., *P. longipedicellata* Waterf., *P. longiloba* Vargas, M. Martínez y Dávila y *P. tamayoi* Vargas, M. Martínez y Dávila (Cuevas-Arias *et al.* 2008).

El género *Physalis* se originó y diversificó en México (D'Arcy 1991, Martínez 1998). El taxón incluye cerca de 90 especies que se distribuyen en Estados Unidos, México, Centro y Sudamérica hasta las Antillas. En México crecen de forma natural 70 especies, el 50% de ellas como endémicas (Martínez *et al.* 2011). *Physalis* se caracteriza por sus corolas amarillas o blanquecinas, subrotáceas a campanuladas, con 5 máculas. El cáliz es acrescente en el fruto, cubre totalmente la baya y se torna papiráceo al madurar (Vargas *et al.* 2003). Por esta particularidad se le da el nombre común de tomate de cáscara (Montes Hernandez y Aguirre Rivera 1994).

Physalis incluye especies de importancia económica y alimenticia. El mayor valor de uso tradicional radica en el consumo de los frutos. En México, los frutos de 17 especies silvestres se recolectan para consumo familiar y venta local (Martínez 1998). Especies como *Physalis pubescens* L., *P. cordata* Mill., *P. angulata* L. y *P. philadelphica* Lam. crecen como arvenses en el agroecosistema de la milpa y son aprovechadas. Los frutos de estas especies en estos sitios alcanzan tallas de 0.8 a 1.5 cm de diámetro. Otras especies

también se desarrollan en este agroecosistema pero los frutos no se consumen por su tamaño pequeño menor a 0.6 mm de diámetro (ej. *P. lagascae* Roem. y Schult., *P. ampla* Waterf.) o por su sabor amargo (ej. *P. solanaceus* Schltdl.). En el país *Physalis philadelphica* es cultivada en diferentes estados para su comercialización. Por su parte, *P. angulata* se cultiva de manera muy localizada sólo en el centro de Jalisco (Sánchez *et al.* 2008) y sus frutos se comercializan bajo el nombre de tomate milpero; en los mercados sobre ruedas se vende a precios elevados, desde 40 a 60 pesos el kg, por lo general sin el cáliz. No obstante, la compra a los productores y venta a los comercializadores mayoristas en los mercados de abastos no supera los diez pesos por kg (Vargas *et al.* en prep.). La preferencia por este fruto debido a sus características culinarias y a su larga vida de anaquel, a pesar de su costo, revela el potencial comercial y valor agrícola de la especie.

Physalis angulata es una herbácea anual de tallos angulosos y hojas ovadas a ovado lanceoladas con borde aserrado y ápice adelgazado. Posee corolas péndulas de 5 mm de largo, angostamente campanuladas con los lóbulos poco expandidos, de color amarillo y máculas de color pardo claro; presenta anteras azules o amarillas, de 1-1.2 mm de largo con filamentos púrpura; el cáliz es globoso con 10 costillas poco notorias y los frutos miden de 11 a 13 mm de diámetro (Vargas *et al.* 2003). Se distribuye desde Estados Unidos de América, México, Panamá, Sudamérica y las Antillas. En México se encuentra en 15 estados, desde Baja California y Durango en el Norte hasta Campeche y Chiapas en el sureste, en un intervalo altitudinal desde el nivel del mar hasta los 2400 m (Nee 1986). Diversas observaciones en campo e invernadero permiten indicar que es una especie autógama (Menzel 1951). En cuanto a su ploidia, se han encontrado individuos diploides (Lydia y Rao 1982) y tetraploides (Menzel 1951, Pedroza 1999).

Los marcadores moleculares basados en la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son utilizados para la caracterización y evaluación de la diversidad genética (Bornet y Branchard 2001, Phong *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). Ejemplo de esto, son las regiones entre secuencias simples repetidas (ISSR) cuyo análisis permite valorar la variación de las regiones inter-microsatélites del genoma (Zietkiewicz *et al.* 1994). Una de

sus ventajas principales es la detección de un alto polimorfismo entre individuos de una población y entre poblaciones, ya que el análisis es sensible a la presencia o ausencia del fragmento genómico reconocido por el iniciador y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada. Debido al requerimiento de temperaturas de alineamiento elevadas, son altamente reproducibles (Zietkiewicz *et al.* 1994).

Antecedentes

Physalis angulata es una especie de reciente introducción al cultivo en México. Su identificación como cultivo fue realizada por Sánchez *et al.* (2008). En el país los trabajos previos sobre la especie abordan la taxonomía, distribución y caracterización morfológica (Nee 1986, Vargas *et al.* 2003). Recientemente se ha hecho la caracterización agronómica y de descripción varietal del material cultivado en Cuquío, Jalisco (Sánchez *et al.* 2005). En otras partes del mundo, los estudios se han enfocado en mayor medida a probar los efectos medicinales de los esteroides que posee la especie. Alves *et al.* (2008) evaluaron los efectos genotóxicos de los extractos e infusiones en las células humanas. Reyes *et al.* (2013) por medio de citometría de flujo, demostraron que las physalinas contenidas en *P. angulata* promueven la apoptosis celular en cáncer de próstata. Rengifo y Vargas (2013) llevaron a cabo una recopilación de los estudios realizados en los últimos 30 años sobre sus usos tradicionales y la importancia de sus componentes químicos. Donkor *et al.* (2012) y Rengifo y Vargas (2013) señalaron que en Sudáfrica y algunos países de Sudamérica, la importancia de esta especie radica en las propiedades medicinales que le confiere el contenido de physalinas y witanolidos. Además, en Brasil se han efectuado algunos ensayos menores en laboratorio para evaluar la viabilidad de las semillas y el efecto de pre-condicionamiento osmótico de las semillas sometidas a diferentes periodos de almacenamiento (Oliveira *et al.* 2014).

Los marcadores moleculares ISSR han sido ampliamente utilizados para evaluar diversidad genética en plantas. Aunque Sanjog *et al.* (2012) encontraron que los marcadores ISSR y RAPDs son igualmente eficientes para evaluar el perfil molecular de la variabilidad genética de *Capsicum* spp, varios autores han demostrado que los ISSR son más informativos que otros marcadores dominantes (ej. RAPDS) por su mayor capacidad de detección de polimorfismos (ej. *Dalbergia oliveri* Gamble ex Prain, Phong *et al.* 2011; *Secale cereale* L., Myskow *et al.* 2010 y *Manguifera indica* L., Samal *et al.* 2012). Además, para algunas especies se ha encontrado que los ISSR suelen ser más efectivos que los marcadores codominantes microsatelites (SSR, simple sequence repeat por sus siglas en

inglés) para detectar la variación genética (eg. *Medicago ruthenica* (L) Trautv., Li *et al.* 2013). Los trabajos de Vargas *et al.* (2011) y Zamora *et al.* (2014) revelan que los ISSR son eficientes para evaluar la diversidad genética de especies de *Physalis*.

Justificación

Physalis angulata tiene importancia económica, cultural y culinaria en el occidente de México. Es un recurso de recolección en condición arvense y es un cultivo regional. Tiene un potencial alto para ser cultivado y comercializado en el resto del país debido a las características del fruto, como tamaño, sabor y larga vida de anaquel. En el contexto del uso, conservación y evolución de los recursos genéticos cultivados resulta relevante estudiar la composición y cambios en la diversidad y estructura genética de las poblaciones cultivadas de una especie silvestre de reciente introducción a cultivo. Por tanto es necesario evaluar la diversidad que está siendo manejada y la presente en poblaciones no manejadas (arvenses). Esta información podría ser utilizada para implementar un manejo adecuado que permita conservar la diversidad genética de *P. angulata*. Este estudio, además de lo anterior, nos brinda la oportunidad de estudiar una especie que se observa en diferentes escenarios evolutivos: en condición silvestre en bosque tropical caducifolio, tolerada en la milpa, creciendo en humedad residual y cultivada. Este será el primer trabajo efectuado sobre la diversidad genética de la especie.

Hipótesis

La selección artificial, la intensidad y el tiempo del manejo son factores que pueden provocar la pérdida de la diversidad genética en especies cultivadas (Yuan *et al.* 2010). Debido a que *Physalis angulata* es un cultivo incipiente, con una antigüedad de labranza cercana a 25 años, que se produce en baja escala bajo un sistema tradicional rústico y poco tecnificado se postula que no existe una pérdida de diversidad genética significativa a causa del manejo. Por lo tanto, las poblaciones arvenses y cultivadas de *P. angulata* mostrarán valores de variación genética similares.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la diversidad genética de *Physalis angulata*.

Objetivos particulares

- Calcular la diversidad genética de poblaciones arvenses y cultivadas de *P. angulata*.
- Estimar la diferenciación genética de poblaciones arvenses y cultivadas de *P. angulata*.
- Cuantificar las relaciones genéticas entre las poblaciones de *P. angulata* estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

Se seleccionaron 11 poblaciones de *Physalis angulata* procedentes de la región donde se recolecta y cultiva de manera tradicional en el occidente de México (Cuadro 1, Figura 1). Tres poblaciones son cultivadas y se obtuvieron de diferentes localidades del municipio de Cuquío, Jalisco, la zona productora de tomate. Las otras ocho poblaciones son arvenses, denominadas así en este estudio porque son plantas silvestres que crecen de manera natural dentro y en los márgenes de cultivos como maíz, agave, garbanzo, entre otros y son toleradas por los agricultores. Éstas se recolectaron en los estados de Jalisco y Michoacán. Las poblaciones de Jalisco pertenecen a los municipios de Yahualica, Zacoalco, Techaluta y Cuquío. Las poblaciones de Michoacán pertenecen a los municipios de Cotija de la Paz, Uruapan y Pajacuarán (Cuadro 1).

Cuadro 1. Información de las poblaciones de *Physalis angulata* estudiadas.

No.	Condición	Código	Núm. Individuos	Estado	Municipio	Colector
1	Arvense	YAH*	24	Jalisco	Yahualica	OVP 2031
2	Arvense	ZAC*	17	Jalisco	Zacoalco	PZT 264
3	Arvense	TECH*	16	Jalisco	Techaluta	OVP 2017
4	Arvense	CUQS*	24	Jalisco	Cuquío	OVP2209
5	Arvense	COT1**	20	Michoacán	Cotija de la Paz	JS_LEV 465
6	Arvense	COT2**	23	Michoacán	Cotija de la Paz	JS_LEV 466
7	Arvense	PAJ**	24	Michoacán	Pajacuarán	JS_LEV 598
8	Arvense	TIN*	24	Michoacán	Uruapan	JS_LEV 478
9	Cultivada	CUQJ**	22	Jalisco	Cuquío	OVP 2022
10	Cultivada	CUQO**	24	Jalisco	Cuquío	OVP 2206
11	Cultivada	OCOT*	21	Jalisco	Cuquío	JS 312

* Hojas tomadas en campo. **Hojas tomadas de plantas crecidas en invernadero a partir de semilla.

Para el análisis genético, de cada población se obtuvieron de dos a tres hojas nuevas (aproximadamente 20 mg de tejido) de 25 plantas individuales o un número menor dependiendo del tamaño de las poblaciones incluidas en el estudio. Las muestras

de hojas de algunas poblaciones se tomaron directamente en campo y se representó la variación al incluir a la mayoría de los individuos (Cuadro 1). Para otras poblaciones, las hojas se tomaron en invernadero, para lo que se germinaron semillas y se cultivaron las plantas. A su vez, las semillas se extrajeron de frutos de diversos individuos de cada población colectados en campo, se mezclaron para integrar una colección y representar a toda la población.

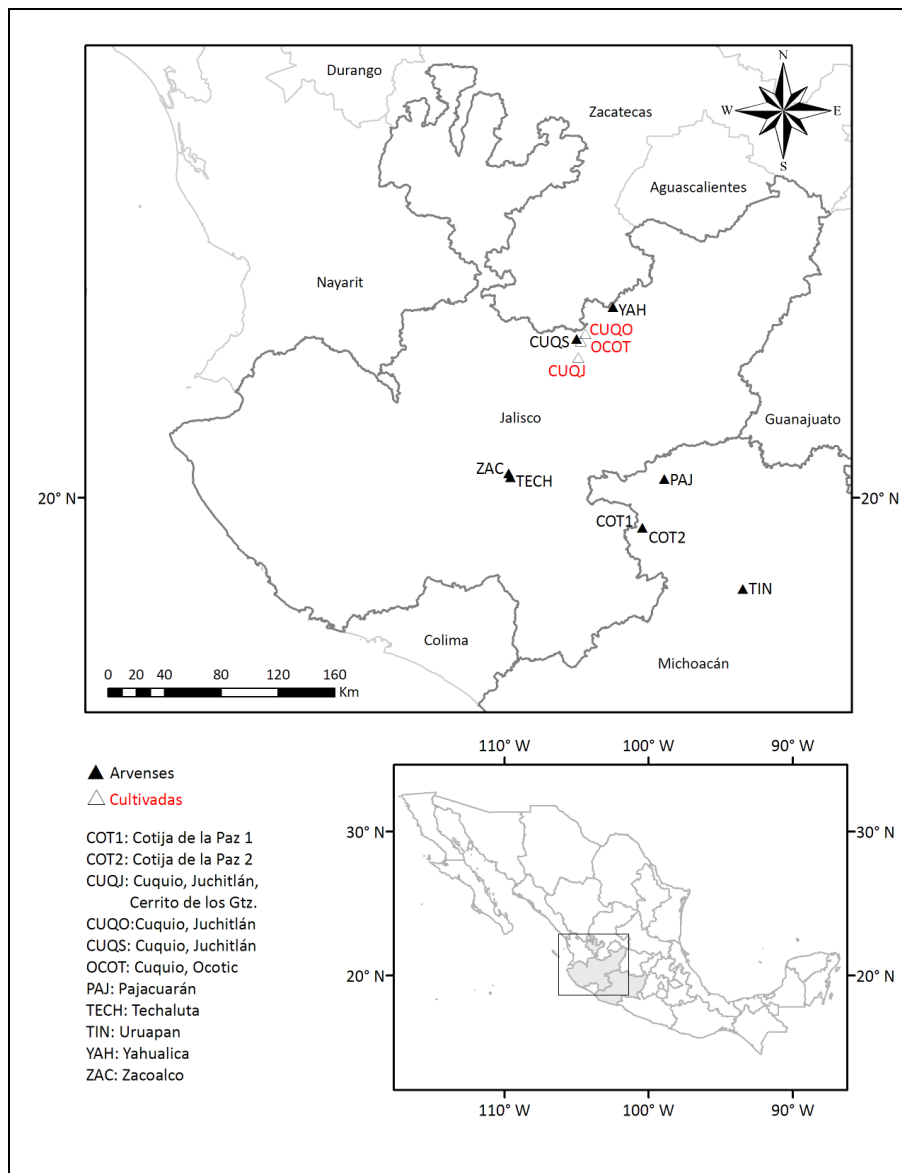


Figura 1. Ubicación de las poblaciones de *Physalis angulata* estudiadas.

Extracción de ADN, generación y visualización de marcadores ISSR

Para la extracción de ADN genómico, se siguió el método del CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) de Doyle and Doyle (1987). La cuantificación y determinación de la calidad del ADN se llevó a cabo por espectrofotometría (Sambrook 2000). La cuantificación fue verificada por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%.

Para generar los marcadores ISSR se probaron nueve iniciadores con motivos de repetición CT, GT, CG, AC y AG. Se eligieron aquellos que generaron bandas polimórficas y reproducibles: I. (CA)₆ RG, II. (CT)₈ RG y III. (CT)₈ TG (cuadro 2). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se usaron las condiciones y temperaturas de alineamiento utilizadas por Vargas *et al.* (2011) en *Physalis*. Cada mezcla de reacción con volumen final de 20 µl contiene 50 ng de ADN genómico, 10 mM de amortiguador para PCR, 2.5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂), 0.3 mM de dNTPs, 0.2 µM del iniciador, 0.5 unidades de *Taq* polimerasa y agua grado HPLC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización por 4 min. a 95° C, seguido de 40 ciclos a 95° C por 1 min., 1 min. de temperatura de alineación (T_m °C) según el iniciador (Cuadro 2), una extensión a 72° C por 2 min. y una extensión final a 72° C por 15 min.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores ISSR, temperatura de alineación, bandas generadas y tamaño en pb (pares de bases) usados en el estudio de *Physalis angulata*. T_m = Temperatura de alineación, R= A, G.

Iniciador	Secuencia	T_m (°C)	Núm. Bandas	Tamaño (pb)
I	(CA) ₆ RG	44.1°	26	180-960
II	(CT) ₈ RG	58.3°	35	270-1000
III	(CT) ₈ TG	54.4°	27	260-1000

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% con urea 7M en amortiguador TBE 1X. La electroforesis se realizó en una cámara dual (CBS Scientific) a 210 volts durante 5 horas. En el caso de los productos amplificados con el iniciador ISSR (CT)8 RG, la duración de corrimiento fue de 6 horas. Se utilizó como referencia marcador de peso molecular de 100 pb. Para la visualización de los productos amplificados, se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.* 1994).

Análisis de datos

La digitalización de cada uno de los geles se realizó en un sistema de fotodocumentación digital (Gel Logic 100, Kodak). Los fragmentos amplificados se analizaron de manera visual y mediante el programa Phoretix 1D (TotalLab). Las imágenes incluyen una primera columna de marcador de peso molecular de 100 pb para estimar el peso de las bandas. Por último, con la información obtenida se generó una matriz de datos binarios (presencia de la banda =1, ausencia de la banda =0) con los genotipos de cada uno de los individuos y de todas las poblaciones. Las bandas con la misma distancia de migración y peso molecular entre individuos se consideraron fragmentos homólogos. Los análisis de diversidad genética se generaron: 1) Por población, 2) Por condición (arvense y cultivada) y 3) Por acervo total (todas las poblaciones). Para diferenciación genética los análisis se realizaron por: 1) Entre arvenses y cultivadas, 2) Por condición y 3) Por acervo total.

Diversidad genética

Para la estimación de la diversidad genética se utilizaron tres parámetros: porcentaje de loci polimórficos (P %), heterocigosidad esperada (H_e) (Nei 1978) y heterocigosidad panmictica Bayesiana (H_B). El cálculo de H_e se basa en las frecuencias alélicas por loci, estimadas a partir de los individuos sin banda; para ello se asumió que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) y se aplicó la corrección de Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes. El estimador H_B para marcadores dominantes no asume que los genotipos de las poblaciones estén en equilibrio H-W y se

basa en la media de la frecuencia de los alelos. Se emplearon los programas PopGene v. 1.31 (Yeh *et al.* 1999) y Hickory versión 1.1 (Holsinger 1999).

Diferenciación genética

El estimador de diferenciación genética F_{st} (Wright 1951), establece la proporción de la varianza en la frecuencia de alelos que se encuentran entre poblaciones. Exhibe valores que van de 0 a 1, donde 0 significa que la población se encuentra en equilibrio H-W. Por lo tanto, si $F_{st} = 0$ no hay diferenciación. Este parámetro se calculó mediante el programa TFGA versión 1.3 (Miller 2000). De igual forma, se calculó el estimador bayesiano de estructura poblacional Θ_B , análogo a F_{st} y el índice de correlación Rho (ρ), que nos indica si existe una correlación de las frecuencias alélicas a través de los loci, entre las poblaciones, con el programa Hickory versión 1.1 (Holsinger 1999). Además, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para describir la varianza entre los componentes y los niveles de significancia para la variación entre individuos dentro y entre poblaciones, usando el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier y Lischer 2010). En adición se estimó el coeficiente de diferenciación Φ_{PT} (estimador análogo a F_{st}) entre pares de poblaciones en el programa GenAlex (Peakall y Smouse, 2005).

Relaciones genéticas

Las distancias genéticas entre las poblaciones fueron calculadas usando el coeficiente de distancia genética de Nei (1978). La matriz de distancias generada se utilizó como base para el análisis de relaciones genéticas, empleando el método de agrupamiento del grupo promedio con media aritmética no ponderada (UPGMA) con el programa TFGA versión 1.3 (Miller 2000). De manera complementaria, se realizó una prueba de Mantel en el programa XLStat-Pro versión 7.5.3 (Addinsoft 1995-2005) donde se verificó si existe una correlación entre las matrices de distancias genéticas y distancias geográficas. Para ello se construyó una matriz pareada de distancias geográficas (km lineales) de las localidades a las que pertenecen las poblaciones estudiadas y se utilizó la matriz de distancias genéticas generada previamente.

Resultados

Se evaluaron en promedio 21 individuos dentro de las 11 poblaciones de *Physalis angulata* (Cuadro 3). Con los tres iniciadores ISSR seleccionados se generaron 88 bandas reproducibles, cada una considerada un locus. Se obtuvieron 26 bandas para el iniciador (CA)₆ RG, 35 para el (CT)₈ RG y 27 para el (CT)₈ TG, mismas que oscilan entre los 180 y 1000 pb (Cuadro 2, figura 2).

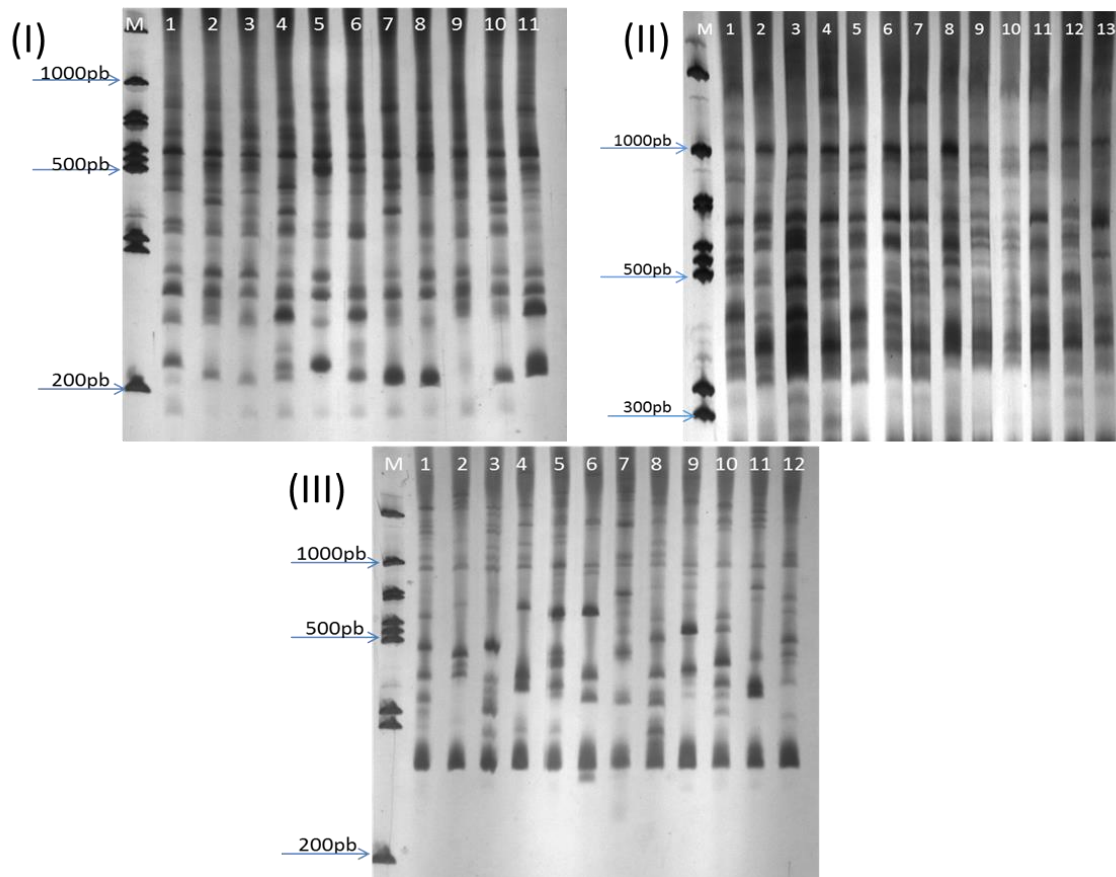


Figura 2. Patrón de bandeo obtenido con los tres iniciadores ISSR en *Physalis angulata* en geles de poliacrilamida. (I)= (CA)₆ RG, individuo del 1 al 11 población ZAC, (II)= (CT)₈ RG, individuos del 1 al 13, población CUQO y (III)= (CT)₈ TG, individuos del 1 al 12 población ZAC. M= marcador de peso molecular de referencia 100 pb.

Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos para el acervo total de *Physalis angulata* fue del 100%. Por condición se encontró que las arvenses presentaron 100% de polimorfismo y las cultivadas 81.82%. A nivel de poblaciones, las arvenses mostraron valores que oscilan entre 42.05 % y 64.77% y las cultivadas entre 46.59% y 48.86%.

La heterocigocidad total esperada por acervo fue de $HT=0.247$. Por categoría de manejo para las arvenses fue de $Ht = 0.246$ y $Ht = 0.227$ para las cultivadas. Este parámetro varió en las poblaciones, desde $He = 0.135$ hasta $He = 0.223$. Por su parte, el estimador de diversidad genética bayesiano para el acervo total fue de $HB = 0.329$, para las arvenses fue de $HB= 0.310$ y para las cultivadas $HB= 0.280$. Las poblaciones presentaron valores de diversidad que van desde $HB = 0.144$ a $HB = 0.231$ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diversidad genética de *Physalis angulata*. A) Por población B) por condición (arvenses y cultivadas y C) por acervo.

Población	Código	N	P	He	HB
A) Por población					
1	YAH ¹	24	44.30	0.151	0.144
2	ZAC ¹	17	52.27	0.172	0.193
3	TECH ¹	16	42.05	0.135	0.154
4	CUQS ¹	24	47.73	0.136	0.160
5	COT1 ¹	20	59.09	0.221	0.225
6	COT2 ¹	23	57.95	0.196	0.196
7	PAJ ¹	24	64.77	0.223	0.231
8	TIN ¹	24	42.05	0.143	0.148
9	CUQJ ²	22	48.86	0.151	0.156
10	CUQO ²	24	46.59	0.146	0.163
11	OCOT ²	21	46.59	0.153	0.170
B) Por condición					
	Arvenses	172	100.00	0.246	0.310
	Cultivadas	67	81.82	0.227	0.280
C) Por acervo					
	<i>Physalis angulata</i>	239	50.20	0.247	0.329

N= Número de individuos, P= porcentaje de loci polimórficos, He= Heterocigocidad esperada (Nei 1978), y HB= Heterocigocidad panmíctica esperada Bayesiana (Holsinger 1999). Ht= heterocigocidad por condición, HT= heterocigocidad total, ¹Arvense, ² Cultivada.

Diferenciación genética

El valor de diferenciación genética entre las 11 poblaciones de *Physalis angulata* estudiadas es de $F_{st} = 0.418$ (cuadro 4). La diferenciación genética entre la condición arvense y cultivada es de $F_{st} = 0.077$. Por su parte, las poblaciones arvenses exhiben un valor de diferenciación de $F_{st} = 0.405$, y las poblaciones cultivadas tienen una $F_{st} = 0.484$. En contraparte, el análisis bayesiano mostró para el acervo total una diferenciación de $\theta_B = 0.519$, con un intervalo de credibilidad de 0.472 a 0.554. Este valor entre la condición arvense y cultivada es de $\theta_B = 0.118$; para el total de las poblaciones arvenses es de $\theta_B = 0.501$, y para las cultivadas es de $\theta_B = 0.538$ (Cuadro 4). El valor de correlación Rho para el acervo total es de 0.143 (95% CrI = 0.094 a 0.203). Entre arvenses y cultivadas el valor es de $Rho = 0.518$ (95% CrI= 0.345 a 0.664). A su vez, para las poblaciones arvenses arrojó un valor de $Rho = 0.153$ (95% CrI= 0.098 a 0.220) y $Rho = 0.031$ (95% CrI=0.000 a 0.101) para las cultivadas.

Cuadro 4. Estimadores de diferenciación genética. F_{st} de Wrigth's (1951) y su análogo el estimador Bayesiano θ_B de Holsinger (1999).

	Weir and Cockerham (1984)			Holsinger (1999)			
	$F_{st} (\theta)$	SD	IC 95%	θ_B	SD	CrI 95%	Rho
<u>A) Entre arvenses y cultivadas</u>							
	0.077	± 0.015	(0.048, 0.108)	0.118	± 0.022	(0.076, 0.163)	0.518
<u>B) Por condición</u>							
Arvenses	0.405	± 0.029	(0.347, 0.458)	0.501	± 0.026	(0.440, 0.545)	0.153
Cultivadas	0.484	± 0.045	(0.394, 0.567)	0.538	± 0.040	(0.452, 0.609)	0.031
<u>C) Por acervo total</u>							
<u><i>Physalis angulata</i></u>	0.418	± 0.027	(0.363, 0.470)	0.519	± 0.020	(0.472, 0.554)	0.143

SD= desviación estándar, IC= intervalos de confianza, θ_B = estimador de diferenciación Bayesiano, CrI= intervalo de credibilidad y Rho= coeficiente de correlación.

El análisis de la varianza molecular AMOVA mostró que el 50% de la variación genética se encuentra entre las poblaciones arvenses y cultivadas y un 50% dentro de las poblaciones mismas (Cuadro 5). Entre la condición arvense y cultivada el valor de diferenciación es muy bajo (ϕ_{ST} = 0.005) y sin diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Valores de diferenciación genética mediante análisis AMOVA de Excoffier *et al.* (1992).

AMOVA	df	SS	VC	%V	ϕ_{ST}
Entre condición	1	177.59	-0.08	-0.51	0.005
Entre poblaciones arvenses y cultivadas	9	1621.14	7.96	50.4	0.501
Dentro de las poblaciones	228	1804.82	7.92	50.1	0.498

df= grados de libertad, SS= suma de cuadrados, CV= componentes de la varianza , %V= porcentaje de la varianza y ϕ_{ST} = estimador análogo a *Fst*.

La comparación entre pares de poblaciones, con los valores de Φ_{PT} ($p \geq 0.001$), arrojó valores de estructura que van de $\Phi_{PT} = 0.359$ a 0.636. El valor de diferenciación más alto se dio entre las poblaciones TIN y TECH con $\Phi_{PT} = 0.636$ mientras que el valor más bajo se encontró entre las poblaciones CUQJ y PAJ con $\Phi_{PT} = 0.359$ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores de Φ_{PT} entre pares de poblaciones de *Physalis angulata*. Diagonal superior, valores de significancia. Se resalta el valor más alto y el más bajo respectivamente.

Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
YAH ¹	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
ZAC ¹	0.536	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
TECH ¹	0.605	0.511	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
CUQS ¹	0.500	0.385	0.525	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
COT1 ¹	0.476	0.385	0.521	0.410	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
COT2 ¹	0.493	0.390	0.517	0.491	0.476	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
PAJ ¹	0.421	0.395	0.476	0.414	0.398	0.402	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
TIN ¹	0.630	0.543	0.636	0.572	0.521	0.535	0.456	0.000	0.001	0.001	0.001
CUQJ ²	0.585	0.543	0.531	0.493	0.470	0.498	0.359	0.498	0.000	0.001	0.001
CUQO ²	0.562	0.480	0.547	0.513	0.461	0.521	0.421	0.548	0.544	0.000	0.001
OCOT ²	0.599	0.467	0.567	0.524	0.475	0.505	0.454	0.605	0.518	0.564	0.000

¹ Arvenses, ² Cultivadas, $p > 0.001$

Relaciones genéticas

La distancia genética de Nei (1978) entre las 11 poblaciones oscila entre $D= 0.0821$ y 0.2663 . Entre las poblaciones arvenses las distancias varían de $D= 0.0903$ a 0.2663 y entre las poblaciones cultivadas varían de $D= 0.0821$ a 0.2252 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Matriz de distancias genéticas de Nei (1978) entre las 11 poblaciones de *Physalis angulata* estudiadas.

Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 YAH ¹	*****										
2 ZAC ¹	0.1467	*****									
3 TECH ¹	0.2118	0.1821	*****								
4 CUQS ¹	0.1371	0.0969	0.1723	*****							
5 COT1 ¹	0.1365	0.0998	0.1953	0.1071	*****						
6 COT2 ¹	0.1475	0.0903	0.1859	0.1425	0.1428	*****					
7 PAJ ¹	0.1160	0.0920	0.1866	0.1100	0.1073	0.1026	*****				
8 TIN ¹	0.2341	0.1922	0.2663	0.2196	0.1723	0.1768	0.1511	*****			
9 CUQJ ²	0.1853	0.1673	0.1849	0.1431	0.1276	0.1448	0.0821	0.1453	*****		
10 CUQO ²	0.1945	0.1707	0.1838	0.1713	0.1623	0.1853	0.1450	0.1807	0.1810	*****	
11 OCOT ²	0.2017	0.1125	0.2026	0.1512	0.1110	0.1351	0.1083	0.2252	0.1426	0.2207	*****

¹ Arvenses, ² Cultivadas

El dendograma generado a una distancia de corte de 0.175 mostró la formación de cuatro grupos. Tres de éstos grupos están conformados por una sola población (I= TECH, II=TIN, y III=CUQO). El cuarto grupo (IV) incluye a cinco poblaciones arvenses y dos cultivadas. La población silvestre YAH se encuentra en base de este grupo con una distancia genética de $D=0.155$ mientras que la cultivada OCOT presenta una distancia menor $D=0.145$; más cercanamente tres pares de poblaciones forman tres subgrupos respectivamente, el primero asoció a la población cultivada de CUQJ con la arvense de PAJ que presentaron las distancias genéticas más cercanas; les siguen el subgrupo de las poblaciones arvenses ZAC y COT2 y el de las silvestres COT1 y CUQS, que se agrupan a $D=0.107$ (figura 3).

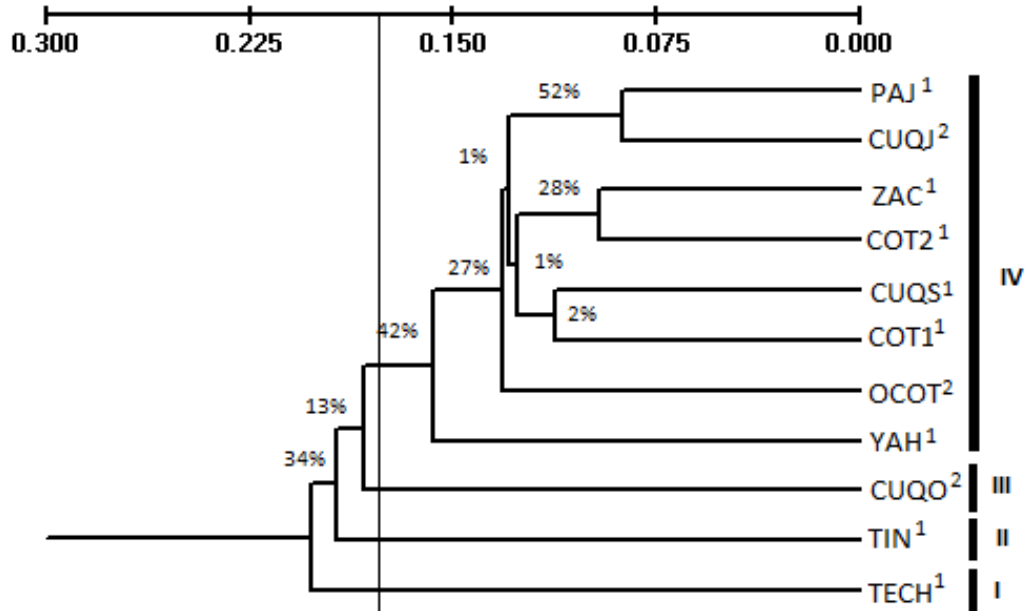


Figura 3. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre las poblaciones de *Physalis angulata* estudiadas. ¹Arvenses, ²Cultivadas. Grupos I,II, III y IV.

La prueba de Mantel mostró que no existe correlación significativa entre las distancias geográficas y genéticas ($p = 0.195$, $\alpha = 0.05$ y 10000 permutaciones aleatorias).

Discusión

Los marcadores moleculares ISSR son útiles y eficientes para evaluar la diversidad genética de *Physalis angulata*. Una de las ventajas importantes que proporcionan es el alto nivel de polimorfismo. Esta característica ayuda a detectar variación genética a diferentes niveles jerárquicos. Se ha demostrado que son altamente efectivos para evaluar la diversidad genética entre diferentes especies y entre poblaciones e individuos de la misma especie (Myskow *et al.* 2010, Vargas *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). Además, se ha comprobado que son igualmente efectivos para evaluar y comparar la variación entre poblaciones con diferentes grados de manejo (Vargas *et al.* 2009, Zamora *et al.* 2014).

Diversidad genética

La diversidad genética de *Physalis angulata* es alta ($HT= 0.2476$, $HB= 0.329$ y $P= 50\%$). Valores similares fueron observados en 7 accesiones silvestres de *Nicotiana tabacum* L. con marcadores moleculares ISSR ($H= 0.2185$, $P= 84.89$, Yang *et al.* 2007). Ambas especies, *P. angulata* y *N. tabacum* son plantas anuales, que presentan autopolinización. Los valores de diversidad encontrados son un poco más altos a los esperados para especies anuales con autofecundación ($H= 0.131$, $P= 43.2$) ya que Hamrick y Godt (1996), indican que las especies con autocompatibilidad tienden a disminuir la heterocigocidad en sus poblaciones. Sin embargo, se ha indicado que especies poliploides tienen una mejor capacidad de colonizar nuevos nichos, mayores tasas de autofecundación y un aumento en la heterocigocidad, resultado del reordenamiento del genoma durante su formación a partir de individuos diploides (Soltis y Soltis 2000). Asimismo, las diferencias en la heterocigocidad según el nivel de ploídia han sido referidas para la herbácea perenne *Tolmieae menziesii* Torr. y A. Gray ($H = 0.070$ en poblaciones diploides, $H = 0.237$ en poblaciones tetraploides). En este contexto, los valores de heterocigocidad altos encontrados en *P. angulata* podrían estar asociados a la posible poliploidia que ha sido reportada para la especie ($4n=48$). Esto no puede aseverarse para las poblaciones estudiadas porque no se conoce su ploídia, sin embargo, los niveles altos de diversidad

podrían estar asociados al número de poblaciones que fueron analizadas (11). Un estudio previo realizado por Zamora *et al.* (2014) con marcadores ISSR en *P. philadelphica*, especie con reproducción exógama, mostró valores de diversidad genética similares a los obtenidos para *P. angulata* ($HT= 0.292$ y $HTB= 0.319$).

Por condición de manejo (poblaciones arvenses vs. cultivadas), los estimadores de diversidad, muestran en promedio un ligero incremento en el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad esperada en las poblaciones arvenses que en las cultivadas (Cuadro 3). La heterocigosidad esperada en poblaciones arvenses es más variable ya que exhibe valores que incluyen el número más bajo hasta el más alto de los encontrados en este estudio ($He=0.1353$ a $He= 0.2238$). A su vez, los valores de las poblaciones cultivadas de Cuquío, son menos variables y homogéneos; en promedio mantienen el 92% de la variación identificada en las arvenses. Esto sugiere que la selección artificial ejercida en ellas hasta hoy día es débil y se ve reflejada en la ligera disminución de la diversidad genética.

La similitud en los valores de heterocigosidad en las poblaciones cultivadas puede estar relacionada con la práctica rústica de su cultivo. El intercambio de semillas entre agricultores y las actividades propias de un cultivo tradicional ayudan a mantener la diversidad genética (Altieri y Merrick 1987). En consecuencia, minimizan la reducción de la diversidad provocada por el cuello de botella y el efecto fundador de la selección artificial. Estos efectos dependen de la duración del periodo de domesticación y el tamaño de la población inicial (Rao y Hodgkin 2002, Doebley *et al.* 2006). En *Phaseolus vulgaris* L. herbácea anual autógena, los valores de heterocigosidad esperada obtenidos con ISSR en poblaciones silvestres y cultivadas no presentan diferencias significativas ($Ht = 0.24$, $Ht = 0.26$, Zizumbo *et al.* 2005). Las poblaciones cultivadas empleadas para este estudio, mantienen su diversidad gracias al manejo tradicional y al cultivo de diferentes variedades locales dentro de la misma parcela. En *Physalis angulata* la ligera disminución de la diversidad sugiere que el cultivo se estableció con un acervo genético diverso y está bajo un proceso de domesticación incipiente con un historial de cultivo corto (25 años de

cultivo, Vargas *et al.* en prep.).

Por otra parte, la población arvense de Techaluta (TECH) que posee el valor más bajo de heterocigocidad esperada no se desarrolla en el ciclo primavera verano, en el período de lluvias, como se ha reportado para la especie (Vargas *et al.* 2003). Esta población crece en el ciclo otoño-invierno en humedad residual junto con garbanzo. Los valores de diversidad pueden estar asociados a un menor tamaño poblacional (cerca a 30 individuos), determinado por la competencia entre las plantas de *P. angulata* y las plantas de garbanzo para desarrollarse, por la humedad existente y por el porcentaje de germinación exitosa del banco de semillas de *Physalis angulata* del sitio. Un patrón similar de diversidad fue observado para una población arvense de *Physalis philadelphica*, que al igual que la población de TECH, crece en humedad residual asociada a garbanzo (Zamora *et al.* 2014). Esto se atribuyó a la competencia con las plantas de garbanzo y a la aplicación de herbicida como parte del manejo agronómico del cultivo del maíz, donde después se establece el garbanzo. No obstante, no hay reportes de la aplicación de herbicidas en la población de Techaluta donde se desarrolla *P. angulata*.

Los valores más altos de heterocigocidad esperada se encontraron en tres poblaciones arvenses de Michoacán (PAJ, COT1 y COT2). Esta región se caracteriza por la presencia tanto de áreas cubiertas por vegetación natural así como por numerosas áreas agrícolas con cultivos comerciales de hortalizas y frutales y cultivos tradicionales de maíz. Los productos regionales, silvestres y cultivados se ofrecen a la venta en mercados tradicionales y a bordo de carreteras. Esto incluye al tomate de cáscara, para el que es común la colecta de frutos de plantas arvenses que crecen en el cultivo del maíz. Las poblaciones COT1 y COT2 se compraron en un mercado tradicional con campesinos diferentes y la de PAJ a bordo de carretera. Es factible que la alta diversidad que exhiben estas poblaciones, se deba a que su colecta incluyó los frutos de todas las plantas de una población o plantas de distintas poblaciones generando una muestra del acervo genético de *Physalis angulata* en esa área. En particular, para la población PAJ, el campesino refirió que la población crece en el cultivo del maíz, donde se tolera y fomenta; se indica además

que las poblaciones de tomate de cáscara son abundantes en la zona y presentan alta densidad de individuos.

Diferenciación genética

El índice de diferenciación obtenido para *Physalis angulata* es alto ($F_{st}= 0.418$, $\theta_B=0.425$). Este valor es propio de especies con autopolinización y de distribución amplia ($F_{st}=0.446$) como lo reportan Hamrick y Godt (1996). Se ha indicado que la estructura genética de una especie es el producto de la interacción de varios factores, entre ellos el sistema de apareamiento y el flujo de genes (Loveless y Hamrick 1984). En *Omphalogramma soulie* Franch (Primulaceae) los valores altos de diferenciación se atribuyen a la xenogamia facultativa y a la autocompatibilidad (Huang *et al.* 2009). En el caso de *P. angulata*, los valores de diferenciación altos entre poblaciones se deben al sistema de apareamiento preferentemente autógamo. Por lo que, las poblaciones a pesar de ser contiguas, tienden a diferenciarse debido al flujo génico bajo o ausente.

Entre categorías de manejo, el valor de diferenciación es bajo ($F_{st}= 0.077$, $\theta_B=0.118$). La diferenciación genética puede verse influenciada por el manejo antropogénico (Doebley *et al.* 2006, Yuan *et al.* 2010). Estos valores nos indican que el manejo no ha ejercido un efecto significativo en las poblaciones cultivadas. Por otro lado, el valor de diferenciación F_{st} en el conjunto de las poblaciones cultivadas se muestra ligeramente más alto que en las poblaciones arvenses. Este patrón de mayor diferenciación en plantas cultivadas o con manejo *in situ* ha sido observado para cactáceas (Parra *et al.* 2010, Contreras *et al.* 2014), agaves (Vargas *et al.* 2009), y *Physalis* (Zamora *et al.* 2014). Esto es más notorio en especies con un historial de cultivo largo que han sido sujetas a presiones de selección intensiva, para incrementar su producción e industrialización. *Physalis angulata* es un cultivo incipiente y rústico que no ha sido sometido aún a esa intensidad y antigüedad de selección. La diferenciación en *P. angulata* es favorecida por su autocompatibilidad, de tal forma que el intercambio de semillas propicia el aumento de la diversidad genética (que se mantiene bajo cultivo dentro de

cada parcela), pero la distribución de esa diversidad sigue siendo la misma debido a la autofecundación.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) nos muestra que la diversidad genética se encuentra repartida en la misma proporción entre poblaciones y dentro de las mismas. El nivel de heterogeneidad genética entre poblaciones generalmente es mayor en especies con poblaciones geográficamente disjuntas, que en especies con distribuciones continuas (Hamrick y Godt 1996). En *Physalis angulata*, el nivel de heterogeneidad no está dado por sus distancias geográficas, si no por el hábito de reproducción. Las poblaciones al no entrecruzarse aunque se encuentren contiguas, conservan su nivel de heterogeneidad genética.

Relaciones genéticas

No se observó una correspondencia entre la distancia genética y la condición arvense de las poblaciones estudiadas de *Physalis angulata* y tampoco aislamiento por distancia. La prueba de mantel revela que no existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas ($\alpha= 0.05$, $p= 0.195$). Incluso dentro de localidades muy cercanas entre sí se detectan distancias genéticas lejanas, como ocurre con dos poblaciones cultivadas de Cuquío CUQO y CUQJ y las de Cotija de la paz COT1 Y COT2 (Cuadro 7). En cambio, la población cultivada CUQJ de Jalisco y la población arvense PAJ de Michoacán exhiben la distancia genética más cercana, aunque geográficamente se encuentran a una distancia de 102 km lineales. El área que divide a estas dos localidades forma parte de la zona de cultivo del bajío, que como se señaló tiene tradición de recolección y venta de tomate silvestre. Asimismo, la zona de Cuquío tiene alta tradición de cultivo de tomate de temporal de lluvias. Además funciona como un centro de comercialización, la venta se realiza con intermediarios entre los que se encuentran compradores de La Barca, quienes compran y venden tomates de Cuquío y, a su vez, compran y comercializan tomate milpero que se recolecta en La Barca y alrededores. Pajacuarán presenta cercanía geográfica con la Barca. Es posible que esta actividad haya generado un corredor de

intercambio de semilla y la cercanía genética entre CUQJ y PAJ se podría explicar a través de este hecho. Las distancias genéticas más lejanas identificadas entre las poblaciones arvenses TIN Y TECH coinciden con su distancia geográfica. En adición, La probabilidad de que la semilla sea intercambiada entre campesinos de ambas zonas es baja, porque son arvenses de recolección que no se cultivan.

El valor de Φ_{PT} calculado entre pares de poblaciones, confirman lo discutido anteriormente. El valor más alto de diferenciación se dio entre las poblaciones de TIN y YAH, ambas arvenses y geográficamente distantes. A su vez, el valor más bajo de diferenciación se dio entre la población cultivada CUQJ y la arvense PAJ. El bajo valor de diferenciación mostrado por estas dos poblaciones podría confirmar la presencia de un corredor geográfico-biológico entre ellas donde se intercambie el fruto o podría sugerir que el material cultivado de Cuquí proviene de la región de La Barca o zonas adyacentes a ésta como se ha sugerido (Vargas *et al.* en prep.) Aunado a esto, los valores de diferenciación altos entre pares de poblaciones de *Physalis angulata* demuestran que la diferenciación genética se ve fuertemente influenciada por su sistema reproductivo.

Conclusiones

El cultivo reciente en poblaciones cultivadas de *Physalis angulata* no ha afectado negativamente su diversidad genética, a esto también contribuyen el manejo rustico y la baja intensidad de selección. Esto coincide con la hipótesis planteada en este trabajo. La distribución amplia de la especie, su carácter malezoide (arvense), la abundancia de poblaciones, el tamaño poblacional no reducido y las ventajas evolutivas que le confiere su poliploidia promueven niveles altos de diversidad genética. Los valores altos de diferenciación se deben en gran parte a la autocompatibilidad mostrada por la especie. Trabajos posteriores podrían incluir poblaciones silvestres que se desarrollen en áreas naturales donde no se desarrolle agricultura. Esto con la finalidad de evaluar la diversidad genética total contenida en la especie y ampliar el conocimiento sobre su dinámica evolutiva.

Referencias

- Addinsoft. 1995-2005. XLStat-Pro versión 7.5.3. México, México.
- Atieri M. A. y L. C. Merrick. 1987. In situ conservation of crops genetics resources through maintenance of traditional farming systems. *Economic Botany* 41: 86-96.
- Alves D. S. R., T. R. Cabral, I. R. Cabral, L. M. G. Antunes, C. P. Andrade, P. C. D. S. Cardoso, M. O. Bahia, C. Pessoa, J. L. M. Do Nascimento, R. R. Burbano y C. S. Takahashi. 2008. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. *Biocell* 32: 195-200.
- Bornet B. y M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Contreras-Negrete G, ME Ruíz-Durán, D Cabrera-Toledo*, A.Casas, O Vargas-Ponce y F. Parra. 2014. Genetic diversity and structure of wild and managed populations of *Polaskia chende* (CACTACEAE) in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico: Insides from allozyme and SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Online first DOI 10.1007/s10722-014-0137-y
- Cuevas- Arias C., O. Vargas Ponce, A. Rodríguez. 2008. Solanaceae diversity in the state of Jalisco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 67-79.
- D'Arcy W. G. 1991. The Solanaceae since 1976, with Rewiew of its Biogeography. Pp. 75-138, en: J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee N. Estrada. (Eds) *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry and Evolution*. Royal Botanical Garden, Kew.
- Doebley J. F., B. S., Gaut y B. C., Smith. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1321.

- Donkor A. M., R. L. K., Glover, J. K., Boateng y V. Y. Gakpo. 2012. Antibacterial activity of the fruit extract of *Physalis angulata* and its formulation. *Journal of Medical and Biomedical Sciences* 4: 21-26.
- Doyle J., and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- 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.
- 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.
- Holsinger K. E. 1999. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas* 130: 245-255.
- Huang Y., C. Q. Zhang y D. Z. Li. 2009. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 103-109.
- Li H. Y., Z. Y. Li, L. Y. Cai, W. G. Shi, F. G. Mi, y F. L. Shi. 2013. Analysis of genetic diversity of *Ruthenia Medic* [*Medicago ruthenica* (L.) Trautv.] in Inner Mongolia using ISSR and SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 1687-1694.
- Loveless M. D y J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Lydia G. y K. G. R. Rao. 1982. A new cytotype of *Physalis angulata* L. *Chromosome Information Service* 32: 3-4.
- Lynch M., y B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic Structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

- Martínez Díaz M. L. 1998. Revisión de *Physalis* Sección *Epeteiorhiza* (Solanaceae). Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 69: 71-117.
- Martínez M., A. Rodríguez, O. Vargas Ponce y F. Chiang. 2011. Catálogo nomenclatural de las Solanaceae de México. Universidad Autónoma de Querétaro. Informe Final SNIB-CONABIO. Proyecto HS004. México, D.F.
www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/infHS004
- Menzel M. Y. 1951. The citotaxonomy and genetics of *Physalis*. Proceedings of the American Philosophical Society 95: 132-183.
- Miller M. P. 2000. Tools for population genetic analysis (TFPGA). Ver 1.3. Northern Arizona University. Arizona, E. U. A.
- Montes Hernández S. y A. Aguirre Rivera. 1994. Etnobotánica del tomate mexicano (*Physalis philadelphica* Lam.). Revista de Geografía Agrícola 19: 163-172.
- Myskow B., P. Milezarski y P. Masoje. 2010. Comparison of RAPD, ISSR and SSR markers in assessing genetic diversity among rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. Plant Breeding and Seed Science 62: 107-115.
- Nee M. 1986. Solanaceae I. Flora de Veracruz 49:1-191. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Oliveira M., C. Mascarenhas, N. Dos Santos, y C. Pelacani. 2014. Preconditioning of *Physalis angulata* L. to maintain the viability of seeds. Acta Amazonica 44: 153-156.

- Parra F., A. Casas, J. M. Peñaloza-Ramirez, A. C. Cortez-Palomec, V. Rocha-Ramírez, A. González-Rodríguez. 2010. Evolution under domestication: ongoing artificial selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacán Valley, México. *Annals of Botany* 106: 483-496.
- Peakall P. y P.E. Smouse, 2005. GENALEX 6: Genetic Analysis In Excel. Population Genetic Software For Teaching And Research. *Molecular Ecology Notes* 288-295.
- Pedrosa A. 1999. Citogenética de angiospermas colectadas em Pernambuco - V. *Acta Botánica Brasil* 13: 49-60.
- Phong D. T., V. T. T. Hien, T. T. V. Thanh y D. V. Tang. 2011. Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in Vietnam. *Genetics and Molecular Research* 10: 2382-2393.
- Rao V. R. y T. Hodgkin. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- Rengifo S. E., y A. G. Vargas. 2013. *Physalis angulata* L. (Bolsa Mullaca): A Review of its Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12: 431-445.
- Reyes E. Jin, Z. Vaisberg, A. Hammond y P. Bates 2013. Physangulidine A, a Withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of Natural Products* 76: 2-7.
- Rodríguez A. 2004. Solanáceas. Pp. 297-303, en: Biodiversidad de Oaxaca. A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez, M. Briones-S (Editores). Instituto de Biología, UNAM, fondo oaxaqueño para la conservación de la naturaleza-WWF. México.
- Routley M. B., K. Mavraganis y C. G. Eckert. 1999. Effect of population size on the mating systems in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis*

(Ranunculaceae). *Heredity* 82: 518-528.

Samal K., R. Jena, S. Swain, B. Das y P. Chand. 2012. Evaluation of genetic diversity among commercial cultivars, hybrids and local mango (*Mangifera indica* L.) genotypes of India using cumulative RAPD and ISSR markers. *Euphytica* 185: 195-213.

Sambrook J., D. Russell y W. David. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez M. J., J. Padilla, O. Vargas-Ponce, B. Bojórquez, G. Romero, M. Aguilar y S. Padilla. 2005. Colecta, caracterización, conservación y aprovechamiento del tomate de cáscara (*Physalis* spp.) y sus parientes cercanos en el occidente de México. *Avances en la investigación científica en el CUCBA. Semana de la investigación científica*.

Sánchez M. J., O. Vargas-Ponce, y P. Zamora-Tavares. 2008. Cultivo tradicional de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) una especie de tomatillo silvestre de México. *Avances en la investigación científica en el CUCBA. Semana de la investigación científica*.

Sanjog T., P. Mahendra, K. Ajit y P. Suman. 2012. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. *Molecular Biotechnology* 51: 137-147.

Sanguinetti C. F., N. Diaz y A. J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on acrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-918.

Soltis P. S. y D. E. Soltis. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7051-7057.

Vargas-Ponce, O., M. Martínez y P. Dávila. 2003. La familia Solanaceae en Jalisco: El género *Physalis*. Colección flora de Jalisco, No. 16. 126 pp. Instituto de Botánica, Departamento de Botánica y Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Guadalajara.

- Vargas-Ponce, O. D. Zizumbo-Villareal, J. Martínez-Castillo, J. Coello-Coello y P. Colunga-GarcíaMarín. 2009. Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and *A. tequilana* comercial plantations. *American Journal of Botany* 96: 448-457.
- Vargas-Ponce, O., L. Pérez, P. Zamora y A. Rodríguez. 2011. Assessing Genetic Diversity in Mexican Husk Tomato Species. *Plant Molecular Biology Reporter* 29: 733-738.
- Vargas Ponce, O., J. Sánchez Martínez, P. Zamora Tavares, y L.E. Valdivia Mares. 2014. *Physalis angulata* L. (Solanaceae): a potential small-scale crop. (En preparación).
- 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.
- Yang B. C., B. G. Xiao, X. J. Chen y C. H. Shi. 2007. Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. *Annals of Applied Biology* 150: 393-401.
- 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.
- Yuan Q. J., Zhang Z. Y., J. Hu, L. G. , Guo, A. J. Shao y L. Q. Huang. 2010. Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae). *Biomedical Central Genetics* 11: 29-42.
- Zamora Tavares, P., O. Vargas-Ponce, J. Sánchez y D. Cabrera. 2014. Diversity and genetic structure of the husk tomato (*Physalis philadelphica* Lam.) in western México. *Genetic Resources and Crop Evolution* . DOI: 10.1007/s10722-014-0163-9.

Zietkiewicz E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Zizumbo-Villareal D., P. Colunga-GarcíaMarín, E. Payró de la Cruz, P. Delgado-Valerio y P. Gepts. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy Domesticated complexes of common bean in a Mesoamerica region. *Crop Science* 45: 1073-1083.

ANEXOS

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

1. Moler el tejido previamente congelado (-40° C) en el lisador a 50 oscilaciones durante 5 minutos.
2. Agregar 800 µl de Buffer de extracción CTAB 2X (incubado previamente a 60°C en baño maría) y mezclar suavemente.
3. Incubar la muestra a 60°C durante 60 minutos en baño maría, agitar por inversión cada 20 minutos.
4. Retirar los tubos del baño maría y dejar a temperatura ambiente de 5 a 7 minutos.
5. Añadir 800 µl de la mezcla cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar por inversión durante 5 minutos.
6. Centrifugar por 30 minutos a 4.500 o 5.000 rpm.
7. Recuperar el sobrenadante que contiene el ADN en tubos de 1.5 µl con pipeta de 200 µl cuantas veces sea posible sin tomar parte del precipitado.
8. Agregar 700 µl de isopropanol frío y mezclar suavemente por inversión hasta obtener la hebra de ADN. Si no obtiene hebra, centrifugar por 2 minutos a 2.000 rpm. Se puede pausar el protocolo en este paso y almacenar las muestras a -20°C.
9. Centrifugar la muestra por 1-2 minutos a 2.500 rpm y eliminar el sobrenadante.
10. Añadir 500 µl de buffer de lavado frío en invertir suavemente, previamente desprender la pastilla. Mantenerlo con buffer de lavado durante 20 minutos. Eliminar el buffer de lavado con pipeta o centrifugar a baja velocidad (2.500 rpm durante 2 minutos).
11. Secar con aire por tiempo corto y resuspender en 200 µl de Buffer TE. Asegurarse

de disolver preferentemente el ADN (sostener el tubo y golpear con la yema del dedo).

12. 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 como se menciona en el paso anterior.
13. Añadir 850 μ l de etanol absoluto frio, inmediatamente mezclar para precipitar el ADN (usar gradilla flexible).
14. Recuperar la hebra o centrifugar durante 5 minutos a 4.500 rpm. Decantar.
15. Lavar con 1 ml de etanol al 70% y mezclar suavemente 5 minutos. Centrifugar durante 2 minutos a 2.500 rpm. Decantar el etanol (repetir este paso 2 veces, solo si la hebra presenta coloración amarillenta).
16. Añadir 80 μ l de Buffer TE para resuspender el ADN. Mezclar suavemente hasta que se disuelva la pastilla. Si no se disuelve, agregar 100-150 μ l. Disolver durante toda la noche a temperatura ambiente.
17. Almacenar el ADN genómico obtenido en congelación a -20°C hasta su uso.

Aforar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a -20°C

Tris 1M

12.11 g Trisma base

60 ml Agua destilada

Ajustar pH con HCl absoluto. Almacenar a 4°C

EDTA 0.5 M pH8

18.6 g EDTA

70 ml Agua destilada

Aforar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C. Importante: solo se disuelve el EDTA cuando se añade NaOH para ajustar el pH.

Anexo 3. Preparación de solución de poliacrilamida

Solución base de Acrilamida (19:1) 40%

Acrilamida	38 g
Bis-acrilamida	2 g
Agua destilada	50 ml

Disolver y aforar a 100 ml

Poliacrilamida 6% Urea 7M

Solución base de Acrilamida 40%	15 ml
TBE 10X	10 ml
Urea	42 g
Agua destilada	30 ml

Se precalienta el TBE y el agua a 50°C y se agrega poco a poco la urea hasta disolverse, se agrega la solución base de acrilamida y se afora a 100 ml.

Polimerización de los geles de poliacrilamida (30ml de poliacrilamida 6% grosor: 1mm)

Perisulfato de amonio (APS)	180 µl
TEMED	60 µl

Anexo 4. Tinción con sales de plata (Sanguinetti 1994)

Solución reveladora

Hidróxido de sodio 30 g
Formaldehído 37% 13.5 ml

Aforar a 1 L con agua destilada

Solución fijadora

Etanol 100 ml
Ácido acético glacial 5 ml

Aforar a 1 L con agua destilada

Solución de nitrato de plata

Nitrato de plata 2 g
Solución fijadora 1 L

Procedimiento:

1. Colocar el gel en solución fijadora durante 10 min. en agitación
2. Decantar la solución fijadora
3. Agregar la solución de nitrato de plata y agitar durante 5 minutos
4. Decantar
5. Lavar con agua destilada aproximadamente 30 segundos
6. Agregar la solución reveladora hasta visualizar las bandas
7. Decantar y lavar con agua corriente
8. Almacenar en acetatos a 4°C