

DIVERSIDAD GENETICA DE 40 GENOTIPOS DE UCHUVA *Physalis peruviana* L. A
TRAVES DE MARCADORES MICROSATELITES

GENETIC DIVERSITY OF 40 GENOTYPES OF UCHUVA *Physalis peruviana* L.
USING MICROSATELITE MARKERS

NATALY DELGADO BASTIDAS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AAGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO

2019

DIVERSIDAD GENETICA DE 40 GENOTIPOS DE UCHUVA *Physalis peruviana* L. A
TRAVES DE MARCADORES MICROSATELITES

GENETIC DIVERSITY OF 40 GENOTYPES OF UCHUVA *Physalis peruviana* L.
USING MICROSATELITE MARKERS

NATALY DELGADO BASTIDAS

TUIO CESAR LAGOS BURBANO I.A., Dr.

Director de trabajo de grado

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniera Agroforestal

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

“La Universidad de Nariño no se hace responsable de las opiniones o resultados obtenidos en el presente trabajo y para su publicación priman las normas sobre el derecho de autor”.

Artículo 13, Acuerdo N. 005 de 2010 emanado del Honorable Consejo Académico.

Nota de aceptación:

Los directores y los Jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por su autor y lo encuentran satisfactorio

Firma del presidente de grado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

San Juan de Pasto, septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

A los investigadores del proyecto de mejoramiento genético de Uchuva *Physalis peruviana* L para la zona alto andina del Departamento de Nariño, quienes me brindaron la oportunidad de desarrollar mi trabajo de grado, y me colaboraron durante el proceso de ejecución.

A mi asesor por brindarme su apoyo, su atención y tiempo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad de Nariño, por acogerme y ofrecerme los conocimientos necesarios a través de sus docentes, quienes aportaron mi formación como profesional y como ser humano.

Al grupo de investigación en producción de frutales andinos por acogerme como integrante del mismo y hacerme participe de sus procesos de investigación.

DEDICATORIA

A mi familia por brindarme el apoyo necesario para cumplir mis objetivos, principalmente a mi madre por permanecer a mi lado, por sus palabras de aliento y sobre todo por su ejemplo de tenacidad y perseverancia.

A mi amor, por ser mi gran motivación e inspiración cada día, por su paciencia, colaboración, por sus palabras siempre acertadas que me alentaron para superar cada obstáculo en esta etapa, pudiendo culminar uno de los primeros logros de mi vida.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y METODOS.....	6
Material genético	6
Cuantificación de ADN	7
Amplificación de los SSRs	7
Análisis de los datos	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
CONCLUSIONES.....	18
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	19

Diversidad genética de 40 genotipos de uchuva *Physalis peruviana* L. a través de marcadores microsatélites

Genetic diversity of 40 genotypes of uchuva *Physalis peruviana* L. using microsatellite markers

Nataly Delgado Bastidas¹

¹Estudiante Ingeniería Agroforestal, Trabajo para optar el título de Ingeniería Agroforestal, Universidad de Nariño, nathalie@udenar.edu.co.

RESUMEN

Physalis peruviana L., conocida como uchuva ha sido ampliamente reconocida por su importancia nutraceútica y económica, pero se sabe poco sobre su diversidad genética a nivel molecular debido principalmente a su estado como especie huérfana, por lo tanto, definir la diversidad genética de las colecciones de germoplasma en esta especie permitirá establecer los niveles de variabilidad genética con los que cuenta el mejorador para el proceso de selección. En el presente estudio se evaluó la variación genética presente en 40 genotipos de uchuva empleando seis marcadores moleculares SSR (Secuencias Simples Repetidas) seleccionados por su alto grado de polimorfismo para *P. peruviana* L. La colección se dividió en tres poblaciones DH (líneas doble haploides), TF (genotipos con tolerancia a *Fusarium oxysporum*), y UDENAR (Universidad de Nariño). Mediante el uso de los programas GenAlex v. 6.5 y Arlequín 3.5.2, se detectaron un total de 7,33 alelos, de los seis cebadores estudiados SSR15 y SSR138 fueron los más informativos, con un total de 22,2% de loci polimórficos, un valor de heterocigosidad esperada promedio de 0,09 el cual se considera bajo, el AMOVA mostró que la varianza dentro de genotipos contribuyó en un 100% evidenciando la inexistencia de una estructura poblacional y concluyendo que el nivel de variabilidad entre genotipos es bajo.

Palabras clave: alelos, heterocigosidad, loci, polimorfismo, variabilidad, SSRs.

ABSTRACT

Physalis peruviana L., known as golden berry has been widely recognized for its nutraceutical and economic importance, but little is known about its genetic diversity at the molecular level mainly due to its status as an orphan species, therefore, defining the genetic diversity of the collections Germplasm in this species will allow to establish the levels of genetic variability that the breeder has for the selection process. In the present study, the genetic variation present in 40 golden berry genotypes was evaluated using six molecular markers SSR (Simple Sequence Repeats) selected for their high degree of polymorphism for *P. peruviana* L. The collection was divided into three populations DH (double haploid lines), TF (*Fusarium oxysporum* tolerant genotypes), and UDENAR (Universidad de Nariño) Through the use of GenAlex v. 6.5 and Arlequin 3.5.2, a total of eight alleles were detected, of the six primers studied SSR15 and SSR138 were the most informative, with a total of 22.2% polymorphic loci, an average expected heterozygosity value of 0.09 which is considered low, the AMOVA showed that the variance within genotypes contributed 100%, evidencing the absence of a population structure and concluding that the level of variability between genotypes is low.

Key words: alleles, genetic variability, heterozygosity, loci, polymorphism, SSRs.

INTRODUCCIÓN

Physalis peruviana L. también conocida como uchuva en Colombia, uvilla en Ecuador, aguaymanto en Perú, topotopo en Venezuela y Golden Berry en países de lengua inglesa (Puente *et al.*, 2011) es una fruta tropical exótica de la familia Solanaceae (Knapp, 2001). Según Vargas *et al.* (2010) el género *Physalis* consta de más de 90 especies nativas de América, con México como centro de diversidad. Dentro de este género se destaca *P. peruviana* por sus altos niveles nutraceuticos, propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Ramadán, 2011; Jin *et al.*, 2012; Kindscher *et al.*, 2014; Takimoto *et al.*,

2014; Castro *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2017), así como sus propiedades nutricionales que incluyen altos niveles de vitaminas A, B y C, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y minerales (Puente *et al.*, 2011; Ramadán, 2011). Además, algunos estudios demuestran que los extractos supercríticos de dióxido de carbono de las hojas inducen la detención del ciclo celular y la apoptosis en células H661 de cáncer de pulmón humano (Wu *et al.*, 2009) y que la 4 β Hidroxi-aganolida (4 β HWE) aislada de tallos y hojas es un potencial agente de quimioterapia contra el cáncer de pulmón (Yen *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo anterior, el cultivo de uchuva ha sido importante en el trópico, dado que es un frutal exportable con grandes ventajas comparativas debido a su producción y suministro permanente a los mercados internacionales. De acuerdo al informe de la asociación Nacional de Comercio Exterior, en 2018 Colombia exportó 7,271 toneladas, siendo los principales destinos de exportación Países bajos, Alemania, Estados Unidos, Reino unido, Canadá y Bélgica, siendo países bajos el líder en importación de esta fruta con una representación total de 57,75% (ANALDEX, 2018). De ahí que, debido a la importancia y al potencial que tiene la especie para desarrollar la fruticultura de la región andina colombiana, es necesario conocer y utilizar los recursos genéticos que existen en el país. En este sentido, Chacón *et al.* (2016) sugieren realizar estudios de colecta, conservación y caracterización para el planteamiento de estrategias de mejoramiento genético de la especie.

Colombia cuenta con germoplasma cultivado y silvestre conservado en centros de investigación y universidades, el cual ha sido evaluado por características biológicas, morfológicas, agronómicas, moleculares y por su reacción a problemas fitosanitarios (Garzón-Martínez *et al.*, 2012; Garzón *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2015; Chacón *et al.*, 2016; Osorio *et al.*, 2016; Simbaqueba *et al.*, 2017).

Por otro lado, entre los marcadores moleculares más útiles para evaluar la diversidad genética en plantas se encuentran los microsatélites o SSR, que son repeticiones en tándem de motivos de ADN que constan de uno a seis nucleótidos (Kalia *et al.*, 2011), los cuales han sido preferidos para estudios genéticos poblacionales en muchos organismos por ser altamente

polimórficos y de herencia codominante (Juyó *et al.*, 2015). Entre los organismos estudiados se encuentran los cultivos andinos de los géneros *Solanum*, *Rubus* y *Passiflora*, entre otros (Ortiz *et al.*, 2012; Bushakra *et al.*, 2015; Juyó *et al.*, 2015).

En cuanto a los estudios de variabilidad genética a nivel molecular de *P. peruviana*, existe una carencia de información debido a la falta de marcadores disponibles de ADN (Garzón *et al.*, 2015) sin embargo, se han realizado algunos trabajos, como los de Bonilla *et al.* (2008) y Morillo *et al.* (2011) quienes utilizaron los marcadores dominantes RAMs (*Random Amplified Microsatellites*; Microsatélites Amplificados al Azar) para evaluar la diversidad genética de colecciones existentes en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira y de la Universidad de Nariño, respectivamente. Simbaqueba *et al.* 2011 identificaron loci polimórficos de SSRs (*Simple Sequence Repeats*; Secuencias Simples Repetidas) con base en las secuencias ensambladas del transcriptoma de la hoja del Ecotipo Colombia.

Garzón-Martínez *et al.* (2012) secuenciaron y ensamblaron el transcriptoma de la hoja de *Physalis peruviana* a partir de su ADNc (ADN complementario) por medio de ESTs (*Expressed Sequence Tags*; Marcadores de Secuencia Expresada), a partir de los cuales diseñaron pares de cebadores para 162 loci SSRs ubicados en regiones no codificantes a partir de regiones codificantes y no codificantes, los cuales fueron evaluados en siete accesiones de *P. peruviana* L. y *Physalis floridana* Rydb., de los cuales 30 fueron polimórficos. Por su parte, Chacón *et al.* (2016) evaluaron la estructura genética de 85 accesiones de uchuva originarias de las cordilleras central, occidental y oriental implementando 15 marcadores moleculares SSRs, encontrando una baja diversidad.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la variabilidad genética de 40 genotipos de uchuva *Physalis peruviana* L. provenientes del AGROSAVIA Tibaitata y de la colección de trabajo de la Universidad de Nariño, a través el uso de marcadores microsatélites SSR.

MATERIALES Y METODOS

Material genético. El material genético estudiado estuvo conformado por 40 genotipos de uchuva *Physalis peruviana* L. (Tabla 1), de los cuales 21 genotipos pertenecen a la colección de trabajo de la Universidad de Nariño (UDENAR) y 19 fueron introducidos desde AGROSAVIA Tibaitata en el año 2015. La introducción de AGROSAVIA está conformada por nueve líneas doble haploides (DH) generadas a partir de cultivo de anteras (Suescún *et al.*, 2011) y diez genotipos con tolerancia a *Fusarium oxysporum* (TF) (González y Barrero, 2011).

Tabla 1. Genotipos de uchuva *Physalis peruviana* L. utilizados en el estudio de diversidad genética mediante marcadores SSR.

AGROSAVIA				UNIVERSIDAD DE NARIÑO			
No.	Introducción	No.	Introducción	No.	Introducción	No.	Introducción
1	12U347-DH	12	09U099-TF	20	UN01	31	UN43
2	12U350-DH	13	09U116-TF	21	UN03	32	UN45
3	12U352-DH	14	09U128-TF	22	UN13	33	UN49
4	12U357-DH	15	09U136-TF	23	UN14	34	UN52
5	12U360-DH	16	09U138-TF	24	UN19	35	Silvania
6	12U368-DH	17	09U140-TF	25	UN26	36	Perú
7	12U374-DH	18	13U407-TF	26	UN30	37	Colombia
8	12U377-DH	19	13U408-TF	27	UN34	38	Puracé
9	12U399-DH			28	UN35	39	Kenia
10	09U086-TF			29	UN36	40	Testigo
11	09U089-TF			30	Neira		

DH = línea doble haploide, TF = grupo tolerante a *Fusarium oxysporum*.

Extracción de ADN. Se utilizaron hojas jóvenes de plántulas de *P. peruviana* L. desarrolladas en los invernaderos de la Universidad de Nariño y AGROSAVIA. Se colectaron de tres a cuatro hojas sin lesiones por cada uno de los genotipos. Estas hojas se preservaron en papel aluminio, se rotularon y se llevaron al laboratorio de biología molecular del Grupo de Investigación en Producción de Frutales Andinos (GPFA) de la Universidad de Nariño, en bolsas herméticas de nylon y se llevaron al congelador a -20°C hasta el momento de su procesamiento. El ADN se aisló siguiendo el protocolo descrito en el kit *GenJET Plant*

Genomic DNA Purification (2017) de Thermo Scientific, tomando 100 mg del material vegetal y se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un tejido pulverizado homogéneo, el cual se colocó en viales cerrados en micro tubos de 1,5 ml a -20°C y se procedió a realizar la extracción de ADN.

Cuantificación de ADN. Para visualizar el ADN obtenido, las muestras se sometieron a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. La cantidad de ADN se determinó mediante el uso de espectrofotometría UV en Nano drop One, para lo cual se tomó 1µl del reactivo Elution buffer del kit de extracción de ADN como blanco. Luego se tomó 1µl de ADN de cada muestra previamente descongelada para obtener la lectura del contenido de ADN en ng/µl (Fierro, 2014). Una vez se conoció la calidad y cantidad del ADN obtenido, se procedió a realizar diluciones en agua HPLC hasta conseguir una concentración de 10 ng/µl. Luego se almacenó a -20°C.

Amplificación de los SSRs. Las muestras de ADN de los 40 genotipos estudiados fueron amplificadas vía PCR con seis marcadores microsatélites específicos de *P. peruviana* L. (Tabla 2) diseñados a partir del transcriptoma foliar de uchuva (Simbaqueba *et al.*, 2011).

Tabla 2. Características de los seis marcadores microsatélites utilizados en el estudio.

IDM	PP (5'-3')	PR (5'-3')	TH (°C)	TE (pb)	RE (Pb)	Mcte
SSR11	CAGCTGAAATAAG AGAGTGATTGG	CCCTCTTTTTTCTC CTCCGAGT	58	180	180-210	AG
SSR15	GCTTGTTGATCAGC TTTCTTTG	TGGATCATAACCT TGCTAATGC	58	172	160-180	AT
SSR112	CTACGCCTACCACT TGCACA	CAGTGGGAAGCCT CAAGATCC	58	203	200-220	TCT
SSR123	TCAGTGGAGCGCG TATATCT	GCGATCTCACCA AACCTCTC	58	216	190-210	ATC
SSR138	TCCGATCACTACTT CAGCACG	CAATTCGGGTTGT GAATCGGGT	58	138	130-160	AAT
SSR146	AGGCTAATGAGGA CGAAGCA	GGTTGCATTACAA AGCACTGA	58	187	160-210	AAAAG

TH= temperatura de hibridación, TE= tamaño esperado en pb, RE= rango esperado en pb y Mcte= microsatélite. Adaptado de: Simbaqueba *et al.* (2011)

Para la amplificación de los marcadores se siguió el protocolo descrito por Thermo Scientific PCR Master Mix (2X), en donde se usó la solución concentrada 2X de Taq ADN polimerasa, dNTPs y MgCl₂, tomando 12,5µl, los cuales se mezclaron con 2µl de cebador reverso, 2µl de cebador promotor, 2µl de ADN y 6,5µl de agua ultra pura, para un volumen final de 25µl. Para amplificar los segmentos de ADN se utilizó un termociclador MultiGene OptiMAX, marca Labnet. Las condiciones de temperatura fueron un ciclo de desnaturalización inicial durante tres minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, en etapa de alineamiento por 30 segundos (la temperatura dependiendo del primer), 72°C en extensión por 90 segundos y finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por ocho minutos (Simbaqueba *et al.*, 2011).

Una vez obtenidos los productos de PCR, las muestras se llevaron a electroforesis vertical en una cámara Mini-protean Tetra Cell, marca Biorad, en geles de poliacrilamida al 6,5% durante 70 minutos a 150 voltios y 400 miliamperios. El tamaño de los productos de amplificación se estimó por comparación con el marcador molecular de 50 pb (Thermo Scientific GeneRuler 50 pb). Una vez finalizó la corrida, los geles se llevaron a una solución con bromuro de etidio para su tinción durante 40 minutos en agitación, una vez transcurrido este tiempo se visualizaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador ENDURO GDS de Labnet.

Análisis de los datos. Los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis de poliacrilamida se registraron en una matriz de datos en Excel que contenía en las filas los individuos y en las columnas los marcadores con sus alelos. La matriz de datos se construyó considerando el tamaño o longitud del fragmento en pares de bases (pb), asignándose a cada individuo dos valores por locus. De tal manera que al presentarse valores similares por locus se consideraron como homocigotos y para valores diferentes se tomaron como heterocigotos (Gil, 2015)

Para cuantificar la diversidad genética de las 40 genotipos se calculó el número de alelos (Na), número efectivo de alelos (Ae), índice de información de Shannon (I), heterocigosidad

esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o), índice de fijación (F) con el programa GenAlex v. 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) y el software Arlequín 3.5.2 (Excoffier *et al.*, 2005) los cuales permiten evaluar la diversidad genética empleando análisis multivariados con parámetros poblacionales. Para cada locus, también se calculó el contenido de información polimórfica (CIP).

Para evaluar las relaciones genéticas entre las poblaciones DH, TF y UDENAR, se construyó una matriz de distancias genéticas de Nei (1972), la cual asume el modelo mutacional de alelos infinitos. Con base en esta matriz, se definió la estructura genética poblacional mediante Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) usando las tres poblaciones asignadas través del programa GenAIEx v. 6.5 con 9999 permutaciones (Excoffier *et al.*, 1992; Peakall y Smouse, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron concentraciones entre 16,4 y 119,4 ng/ μ l de ADN con calidad y pureza aceptable reflejada en la relación A260/280 entre 1,67 y 1,89 y proporción 260/230 entre 2,16 y 3,24 (Alejos *et al.*, 2014). Sin embargo, este no es un factor limitante puesto que los microsatélites requieren pequeñas cantidades de ADN para su amplificación, lo cual es una de las principales ventajas de estos sobre otros marcadores basados en PCR (Yadav *et al.* 2007).

En la Tabla 3 se muestran los índices de diversidad de los marcadores SSR utilizados para evaluar la diversidad genética de 40 genotipos de *Physalis peruviana*, los cuales corresponden al número de alelos (N_a), alelos efectivos (A_e), índice de información (I), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), contenido de información polimórfica (CIP) e índice de fijación (F).

Tabla 3. Índices de diversidad genética para 40 genotipos de uchuva utilizando marcadores SSR.

Locus	Na	Ae	I	Ho	He	CIP	F
SSR11	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
SSR15	1,33	1,07	0,10	0,06	0,06	0,09	-0,11
SSR112	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
SSR123	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
SSR138	2,00	1,99	0,69	0,97	0,50	0,51	-0,94
SSR146	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
Promedio	1,22	1,22	0,13	0,17	0,09	0,12	-0,73

Se obtuvieron entre uno y dos alelos por locus, para un total de 7.33 alelos y un promedio de 1,22. Se pudo observar que los tamaños de alelos observados fueron cercanos a los tamaños de alelos esperados reportados por Simbaqueba *et al.* (2011). Sin embargo, el número de alelos por locus encontrado en este estudio fue bajo respecto a los estudios de Chacón *et al.* (2016) quienes obtuvieron un valor promedio de Na de 3,05 y los de Wei *et al.* (2012) quienes reportaron valores entre 3,3 y 4,4 en 22 introducciones de *Physalis philadelphica* y 14 accesiones de otras especies de *Physalis* incluyendo tres de *P. peruviana*. Estos registros son muy superiores a las tres poblaciones analizadas, cuyo Na es de 1,22 y sus Ae oscilan entre 1,17 y 1,20 (Tabla 4).

Tabla 4. Índices de diversidad genética determinados mediante marcadores SSR para 3 poblaciones de uchuva.

Población	N	Na	Ae	I	Ho	He	F
DH	9,00	1,17	1,17	0,12	0,17	0,08	-1,00
TF	10,00	1,17	1,17	0,12	0,17	0,08	-1,00
UDENAR	21,00	1,33	1,20	0,17	0,18	0,11	-0,47
Promedio	13,3	1,22	1,18	0,13	0,17	0,09	-0,73

N= número de individuos, Ae= número de alelos efectivos, Na= número de alelos I= índice de Información, Ho= heterocigosidad observada, He= heterocigosidad esperada, F= índice de fijación.

Con relación a lo anterior, Garzón *et al.* (2015) reportaron dos alelos por locus usando marcadores SNPs en la evaluación de diversidad genética de *P. peruviana*, valor semejante

al obtenido en este estudio, lo que sugiere que a pesar de la naturaleza variable en el nivel de ploidía de *Physalis* spp (Liberato *et al.*, 2014), las especies del género podrían comportarse como alotetraploides. En *Solanum lycopersicom*, Choudhary *et al.* (2018) indican que en 25 marcadores SSR, se produjeron 65 alelos y el número de alelos a través de todos los loci osciló entre dos y cinco con una media de 2,72 alelos por locus, lo cual es superior a lo registrado en este estudio.

Por otro lado, el número de alelos efectivos (A_e) osciló entre 1,0 y 1,99 con una media de 1,22. Esta variable hace referencia a la capacidad de los alelos de pasar a la siguiente generación (Yañez, 2002). En *Solanum tuberosum*, Juyó (2012) reportó rangos de A_e entre 0,91 y 2,48 con marcadores microsatélites SSR. Valores en su mayoría superiores a los encontrados en este estudio.

En cuanto a la heterocigosidad observada (H_o) fue de 0,17, la esperada (H_e) fue de 0,09 y el contenido de información polimórfica (CIP) de 0,12, con un índice de fijación (F) de -0,73. De los seis marcadores microsatélites amplificados en los 40 genotipos de uchuva se encontró que el 77,8% de estos fueron monomórficos y 22,2% polimórficos (Tabla 3).

El locus SSR más polimórfico fue SSR138 con un CIP de 0,51, seguido de SSR15 con un CIP de 0,09 y un promedio de 0,12 para toda la colección, este valor cataloga a los marcadores empleados en un rango de loci con polimorfismo bajo de acuerdo a Ge *et al.* (2013) evidenciando valores poco discriminativos. Tomando en consideración el valor de CIP obtenido para el SSR15, este se mostró mucho más bajo que el reportado por Chacón *et al.*, (2016) quienes obtuvieron un CIP de 0,56 para SSR15 siendo este el más polimórfico en su estudio, con un promedio de 0,215 en un conjunto de 15 marcadores microsatélite para evaluar patrones de diversidad genética en diferentes regiones geográficas de Colombia. De igual manera Garzón *et al.* (2015) obtuvieron un valor de CIP promedio de 0,37 en un rango entre 0,09 y 0,66 en el análisis de un conjunto de 47 accesiones de *P. peruviana* y 13 taxones relacionados con 24 marcadores InDel.

El hecho que solo dos de los seis marcadores estudiados hayan presentado polimorfismo se debe a que los microsatélites fueron diseñados a partir de regiones UTR (*untranslated regions*; regiones no traducidas) resultado de la secuenciación del transcriptoma foliar de uchuva (Simbaqueba *et al.*, 2011).

El marcador SSR15 y el marcador SSR138 fueron los únicos que permitieron visualizar polimorfismo en los genotipos estudiados, con bandas entre 160 y 180 pb para el primero y entre 130 a 160 pb para el segundo. En la Figura 1, se muestra un ejemplo de los patrones de bandas generados por los marcadores evaluados.

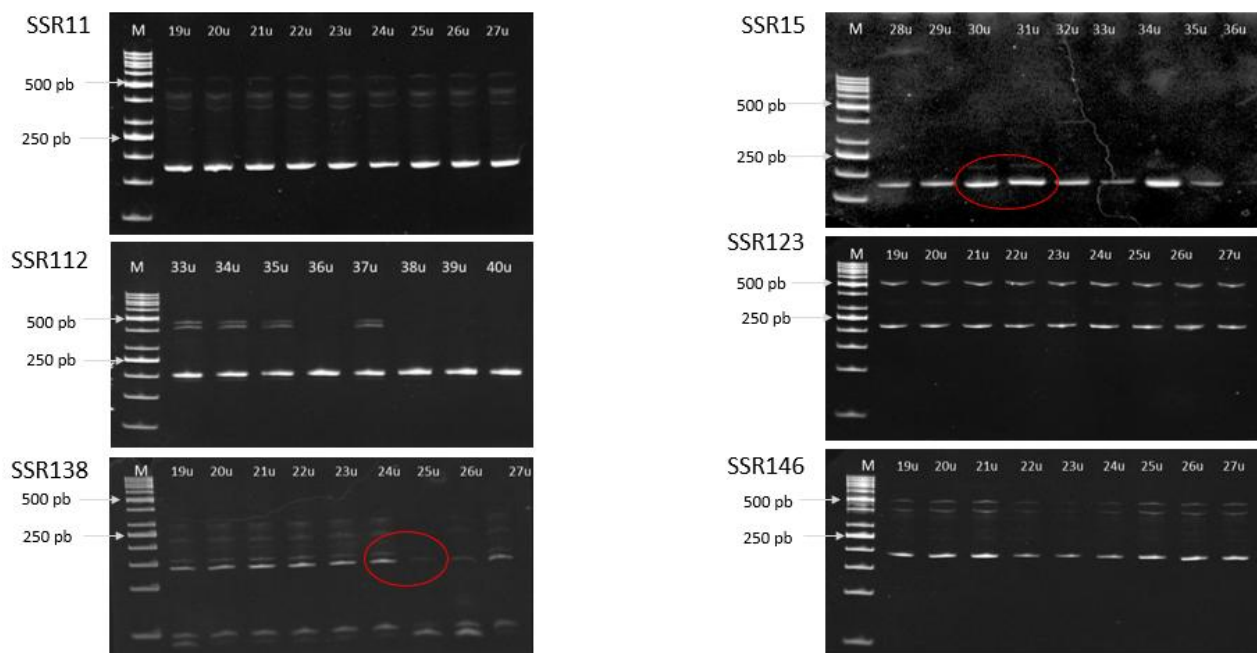


Figura 1. Muestra de patrones de bandas obtenidos con para los marcadores SSR11, SSR15, SSR112, SSR123, SSR138, SSR146 con marcador de peso de 50pb.

De igual manera, la variabilidad reportada en la especie, por Simbaqueba *et al.* (2011) se centró en los polimorfismos identificados en *Physalis floridana* con los marcadores SSR112, SSR123 y SSR138, que hicieron parte de los marcadores moleculares empleados en este estudio, los cuales no mostraron variación excepto para el marcador SSR138, tal como se observa en los valores de los índices de diversidad obtenidos (Tabla 3).

Como se menciona anteriormente se encontró un 22,2% de porcentaje de loci polimórficos, el cual se mostró bajo comparado con el reportado por Morillo *et al.* (2011), quienes usaron marcadores RAMs, en 18 introducciones de uchuva de la colección de la Universidad de Nariño con un promedio del 86%. De igual manera, Morillo *et al.* (2018) reportaron un valor del 79,26% utilizando marcadores moleculares RAMs en la caracterización de la diversidad genética de 15 materiales silvestres de uchuva.

El índice de información de Shannon (I) osciló entre cero y 0,69. Los cebadores SSR11, SSR112, SSR123 y SSR146 obtuvieron un I de cero, mientras que SSR15 y SSR138 de 0,10 y 0,69 en su orden (Tabla 3). Esto explica que la riqueza alélica de los genotipos analizados es media a baja. Según Costa, (2014) a medida que el valor de I se acerca a uno existe un más alto nivel de diversidad detectada, por tal razón el marcador SSR138 fue el más informativo. Juyó (2012) encontró valores de I entre 0,489 y 1,130 en *Solanum tuberosum* los cuales se mostraron superiores en comparación con los valores obtenidos en este estudio.

Por otra parte, se encontró que la población DH y la población TF presentaron menor riqueza alélica con un I de 0,12 en comparación a la población UDENAR la cual evidenció la mayor riqueza alélica frente a las demás poblaciones con un valor de 0,17 (Tabla 4), de tal manera que esta población es mayormente diversa (Costa, 2014) sin embargo estos resultados siguen siendo bajos para revelar valores de diferenciación significativa de diversidad entre poblaciones.

Los valores de He oscilaron entre 0,06 y 0,50 para los cebadores SSR15 y SSR138 respectivamente. El valor promedio para seis marcadores SSR estudiados fue de 0,09 (Tabla 3), el cual es mucho menor al reportado por Morillo *et al.* (2018), quienes caracterizaron la diversidad genética de 15 materiales silvestres de *P. peruviana* utilizando marcadores microsátélites RAMs, y encontraron una He de 0,27. De igual manera, Bonilla *et al.* (2008) reportaron una He de 0,25 aunque debe considerarse que en su estudio utilizaron una población diferente y un conjunto de marcadores dominantes RAMs que pueden sobrestimar

la diversidad alélica en comparación con la naturaleza codominante de los marcadores utilizados en la presente investigación (Garzón *et al.*, 2015).

Chacón *et al.* (2016) utilizaron marcadores SSR en uchuva ellos reportaron un valor de H_e de 0,22 mostrándose superior al registrado en este estudio, sin embargo, lo consideran bajo debido al tamaño de la muestra, el origen de las accesiones y el tipo de marcador molecular utilizado. De igual manera, Garzón *et al.* (2015) quienes trabajaron con germoplasma de *P. peruviana* y marcadores InDels y SNPs reportan una H_e de 0,30 y consideran con base en este registro, que existe alta variabilidad genética debido a la naturaleza alógama de la especie que cuenta con 54% de polinización cruzada. La H_e obtenida en las poblaciones fue de 0,11 para UDENAR, de 0,08 para TF y de 0,08 para DH (Tabla 4), valores que corroboran lo anteriormente descrito.

El promedio de H_o fue de 0,17 con un rango entre cero para SSR11, SSR112, SSR123 y SSR146, y de 0,97 para SSR138, el marcador SSR15 obtuvo una H_o de 0,06. Del mismo modo en todas las poblaciones la H_o fue mayor que H_e (Tabla 3 y 4). Igualmente, Garzón *et al.* (2015) reportaron una H_o mayor que la esperada, como es el caso de InDels con H_o de 0,448, H_e de 0,30 y SNPs de H_o de 0,59 y H_e de 0,41.

Por otro lado, se obtuvieron dos valores de índice de fijación o endogamia (F) en los dos loci polimórficos (Tabla 3), los cuales fueron negativos, con un valor promedio de -0,73. Esto indica la presencia de individuos heterocigotos, como se puede esperar de una especie autocompatible, pero cruzada (Lagos *et al.*, 2008). Respecto a esta variable, Chacón *et al.* (2016) también encontraron valores de F negativos (entre -0,049 y -1,00) en una colección de uchuva que fue caracterizada con marcadores microsatélites. El índice de fijación promedio obtenido para las tres poblaciones fue -0,73 (Tabla 4).

La distancia genética de Nei, (1972) entre las accesiones presentó un promedio de 0,001, con un mínimo de 0,00 y un máximo de 0,002 (Tabla 5). La menor distancia genética se presentó entre el grupo DH y TF con un valor de 0,00 probando que existe mayor similitud genética,

esto demuestra que los genotipos de estas dos poblaciones están muy relacionados entre sí. La mayor distancia genética se encontró en el grupo UDENAR comparado con el grupo de las accesiones de DH y TF, las cuales mostraron un valor de 0,002, lo que hace que estas poblaciones estén genéticamente menos relacionadas. Estas distancias genéticas son mucho más bajas en comparación de los reportes de Chacón *et al.* (2016) quienes presentaron una distancia igual a 0,13, del mismo modo, Wei *et al.* (2012) publicaron un valor de 0,22 en *Physalis philadelphica*.

Tabla 5. Distancia genética de Nei entre pares de poblaciones de *Physalis peruviana*.

	DH	GF	UDENAR
DH	0,000		
GF	0,000	0,000	
UDENAR	0,002	0,002	0,00

Los estadísticos de F Wright correspondientes al coeficiente de endogamia (Fis), al índice de fijación genético global (Fit), índice de diferenciación génica (Fst) y la tasa de flujo génico estimada (Nm) se muestran en la Tabla 6. De acuerdo a las estimaciones de Fis y de Fit estas se mostraron con valores promedio negativos en los loci polimórficos (-0,524), (-0,486) respectivamente, por lo tanto, tal como se mencionó anteriormente, se reconoce la presencia de individuos heterocigotos (Wright,1978). Sin embargo, es importante aclarar que los valores obtenidos en los estadísticos de F únicamente se asumieron para los dos marcadores microsatélites encontrados en este estudio como polimórficos y no para el resto, sugiriendo endogamia entre los individuos analizados, por lo tanto, se consideraría como una especie autógena o como lo mencionan Lagos *et al.* (2008) de polinización mixta.

Tabla 6. Estadísticos de F Wright en 40 genotipos de *Physalis peruviana* L. caracterizados con seis marcadores SSRs.

Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
SSR11	-	-	-	-
SSR15	-0,105	-0,033	0,066	3,532
SSR112	-	-	-	-
SSR123	-	-	-	-
SSR138	-0,942	-0,938	0,002	123,65
SSR146	-	-	-	-
Promedio	-0,524	-0,486	0,034	21,203

Fis= promedio del coeficiente de endogamia; Fit= índice de fijación genético global; Fst= diferenciación génica; Nm= tasa de flujo génico estimada (Nm).

El promedio de Fst fue de 0,034, Al respecto, Morillo *et al.* (2018) encontraron en el marcador RAMs CGA evaluado en *P. peruviana*, un Fst alto (0,44) contrario a lo obtenido en el presente estudio. Los valores de Fst entre cero y 0,05 indican una diferenciación genética baja entre poblaciones, la cual está asociada con la dinámica espacio temporal y el nivel de estructuración a la cual están sometidos los materiales de uchuva en su entorno natural (Hartl y Clark, 1997). La baja diferenciación genética entre poblaciones podría explicarse por el intercambio de germoplasma entre regiones productoras de uchuva y por un efecto fundador de estrecha base genética, lo cual las hace muy similares.

El valor de flujo genético (Nm) muestra que aproximadamente 21 individuos migran por generación entre las tres poblaciones estudiadas. La inexistencia de diferenciación entre las poblaciones, puede explicarse también por el valor de flujo génico entre las mismas resultando un valor de 21,2 evidenciando flujo genético constante entre las poblaciones estudiadas. Según Ruiz *et al.* (2015) cuando se presenta un valor de Nm superior a cuatro, se evidencia alto flujo génico entre las poblaciones consideradas.

Los resultados del AMOVA indican que la varianza genética entre poblaciones fue de cero, al igual que la varianza genética entre genotipos (Tabla 7), mientras que la varianza dentro de genotipos contribuyó a la varianza total en un 100%. Estos datos indican que no existe una estructura poblacional dada las distancias genéticas tan pequeñas encontradas.

Tabla 7. AMOVA para 40 accesiones de *P. peruviana* divididos en tres poblaciones basado en marcadores SSR.

FV	GL	SC	CM	Var. Est	% de var
Ente poblaciones	2	113,10	56,55	0,70	0%
Entre genotipos	37	1461,90	39,51	0,00	0%
Dentro de genotipos	40	17900,00	447,50	447,50	100%
Total	79	19475,00		448,20	100%

Garzón *et al.* (2015) trabajaron con marcadores SNPs e InDels, con los cuales hallaron un porcentaje de variación entre las poblaciones con el 5 y 23%, respectivamente, mientras que dentro de poblaciones encontraron un mayor porcentaje de variación con resultados para SNPs de 95% y para InDels 73%. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en este estudio debido que se encontró mayor variación dentro que entre poblaciones, aspecto que debe tenerse en cuenta al momento de considerar estrategias de conservación y reproducción donde se desea obtener más variación. De acuerdo a los bajos valores de diversidad y diferenciación genética, puede decirse que al haber un elevado movimiento de individuos la variabilidad genética de cada población es similar y esto causaría la poca variación entre las poblaciones.

En este estudio, la aplicación de marcadores microsatélites SSR, en 40 genotipos de uchuva, reveló una diversidad genética baja, los marcadores SSR mostraron un valor de CIP promedio de 0,12 para toda la colección, que según Ge *et al.* (2013) se catalogan en el rango de loci con polimorfismo bajo.

De igual manera, la baja disponibilidad de marcadores moleculares en especies que recientemente están tomando importancia desde el punto de vista comercial, como *P. peruviana*, ha sido un cuello de botella para la evaluación de la variabilidad genética que podría apoyar las estrategias de mejoramiento. No obstante, los marcadores codominantes como SSRs, conservados en especies relacionadas como tomate, se han utilizado en estudios genéticos en *Physalis* (Bonilla *et al.*, 2008; Morillo *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2012).

A pesar que se han reportado marcadores SSR en *P. peruviana* (Simbaqueba *et al.*, 2011), uno de los principales inconvenientes de éstos es la presencia de alelos nulos relacionados con mutaciones en los sitios de hibridación del cebador que pueden conducir a errores en el genotipado (Kumar *et al.*, 2009), como puede ocurrir con estos marcadores, que se diseñaron a partir de regiones no traducidas, por lo tanto, son menos polimórficos que los SSR genómicos (Ellis y Burke, 2007), lo cual explica el bajo porcentaje de polimorfismo encontrado en este estudio.

CONCLUSIONES

Los 40 genotipos de uchuva *Physalis peruviana* L. exhibieron una diversidad genética baja con un alto flujo genético sin detectarse una estructura poblacional. Los indicadores de variabilidad como heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, contenido de información polimórfica e índice de Shannon también presentaron valores bajos.

Los microsatélites que brindaron mayor detección de polimorfismo, y, por lo tanto, revelaron información discriminante fueron el SSSR15 y el SSR138, los cuales exhibieron una mayor riqueza alélica y contenido de información polimórfica. Sin embargo, no fueron lo suficientemente informativos para revelar la variabilidad genética de los genotipos estudiados por lo tanto se hace necesario aplicar técnicas como la secuenciación, puesto que este proceso permite encontrar cambios en un solo nucleótido permitiendo identificar diferencias a nivel molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANALDEX - Asociación Nacional de Comercio Exterior (2018). Informe de exportaciones de Uchuva 2018. Recuperado de <https://www.analdex.org/2018/02/26/mercado-de-la-uchuva/>
- Alejos, L., Aragón, M. & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., Rocha, M. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. pp. 1-26. Primera edición. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología y cambio climático (INECC). 256p.
- Bonilla, M., Piedrahíta, K., Mauricio, A., Terranova, P., Amariles, D., Eduardo, J. & Flórez, M., (2008). Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. *Acta Agron.* 57(2): 109–115
- Bushakra, J., Lewers, K., Staton, M., Zhebentyayeva, T. & Saski, C. (2015). Developing expressed sequence tag libraries and the discovery of simple sequence repeat markers for two species of raspberry (*Rubus L.*). *BMC Plant Biol.* 15(1): 258. doi: 10.1186/s12870-015-0629-8
- Castro, J., Ocampo, Y. & Franco, L. (2015). Cape Gooseberry (*Physalis peruviana L.*) calyces ameliorate TNBS acid-induced colits in rats. *Journal of Crohn's and Colits*, 9(11): 1004-1015.
- Chacón, M., Sánchez, Y. & Barrero, L. (2016). Genetic structure of a Colombian Cape gooseberry (*Physalis peruviana L.*) collection by means of microsatellite markers. *Agronomía Colombiana.* 34(1): 5-16.
- Choudhary, P., Kumar, G., Bagati, S., Jamwal, D., Bhadwal, D., Raj, V. & Kumar, P. (2018). Evaluation of genetic variability in tomato (*Solanum lycopersicum L. Mill*) genotypes using microsatellite markers. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 7(1): 2117-2124
- Costa, S. (2014). *Variabilidad genética de Chenopodium quinoa Wild. En el Noreste Argentino y su relación con la dispersión de la especie* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.

- Ellis, J. & Burke, J., (2007). EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*. 99(2): 125–132
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131(2), 479-491.
- Excoffier L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 1:47–50.
- Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. & Rocha, M. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. pp. 27-52. Primera edición. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología y cambio climático (INECC) 256p.
- Garzón, G., Osorio, J., Delgado, P., Mayorga, F., Enciso, F., Landsman, D., Mariño, L. & Barrero, L. (2015). Genetic diversity and population structure in *Physalis peruviana* and related taxa based on InDels and SNPs derived from COSII and IRG markers. *Plante gene*. (4): 29-37.
- Garzón-Martínez, G., Zhu, Z., Landsman, D., Barrero, L, y Mariño, L. (2012). The *Physalis peruviana* leaf transcriptome: assembly, annotation and gene model prediction. *BMC Genomics*, 13(1), p. 151-162.
- Ge, H., Liu, Y., Jiang, M., Zhang, J., Han, H. & Chen, H. (2013). Analysis of genetic diversity and structure of eggplant populations (*Solanum melongena* L.) in China using simple sequence repeat markers. *Sci. Hortic*. 162, 71–75
- GenJET Plant Genomic DNA Purification (2017). Kit de extracción de ADN. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0791#/K0791>
- Gil, J. (2015). Identificación de microsatélites polimórficos por amplificación cruzada en *Anadara similis* (Mollusca: Arcidae). Recuperado de <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/7973/1/CB-0516677.pdf>
- González, C.A. & Barrero, L.S. (2011). *Estudio de la marchitez vascular de la uchuva para el mejoramiento genético del cultivo*. Colombia: Cámara de Comercio de Bogotá. 44 p.

- Hartl, D. & Clark, G. (1997). *Principles of Population Genetics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Hassan, H., Serag, H., Qadir, M. & Ramadán, M. (2017). Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) juice as a modulator agent for hepatocellular carcinoma-linked apoptosis and cell cycle arrest. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 94(1): 1129-1137.
- Jin, Z., Mashuta, M., Stolowich, J., Vaisberg, J., Stivers, N., Bates, P., Lewis, W. & Hammond, G. (2012). Physangulidines A, B, and C: three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L. *Org. Lett.* 14(5): 1230-1233.
- Juyó, D. (2012). *Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa* (Trabajo de grado Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Colombia.
- Juyó, D., Sarmiento, F., Álvarez, M., Brochero, H., Gebhardt, C. & Mosquera, T. (2015) Genetic diversity and population structure in diploid potatoes of group *Phureja*. *Crop Science*, 55(2): 760-769
- Kalia, R., Rai, M.K., Kalia, S., Singh R. & Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177(3): 309-334. doi: 10.1007/s10681-010-0286-9
- Kindscher, K., Cao, C., Gallagher, R., Zhang, H., Long, Q. & Timmermann, B. (2014). Comparison of bioactive secondary metabolites in experimental and natural populations of wild tomatillos, *Physalis longifolia* Nutt. *Ethnobot. Res. Appl.* 12: 175-182
- Knapp H., Winterhalter P. & Duque C. (2001). Glycosidically bound flavor compounds of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(4): 1904-1908.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D., Pandey, B. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics J.* 2(4): 141-162.
- Lagos, T., Vallejo, F., Criollo, H. & Muñoz, J. (2008). Biología reproductiva de la uchuva. *Acta Agron.* 57(2): 81-87

- Liberato, S., Sánchez, E., Argüelles, J., González, C., Núñez, V. & Barrero, L. (2014). Cytogenetics of *Physalis peruviana* L. and *Physalis floridana* rydb. Genotypes with differential response to *Fusarium oxysporum*. *Rev. Corpoica Cien. Tecnol.* 15(1): 51-61.
- Martínez, G., Guarín, J., Durán, P., Mayorga, F., Rodríguez, F., Landsman, D., Ramírez, L. & Barrero, L. (2015). Genetic diversity and Population structure in *Physalis peruviana* and related taxa based on Indels and SNPs derived from COSII and IRG markers. *Plan Gene*, 4(1): 29-37.
- Morillo, A., Gonzales, J. & Morillo, Y. (2018). Caracterización de la diversidad genética de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Boyacá. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 16(1): 26-33.
- Morillo, A., Villota, D., Lagos, T., Ordóñez, R. (2011). Morphological and Molecular Characterization of 18 Introductions of Cape Gooseberry *Physalis peruviana* L. collection of the University of Nariño. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 64(2): 6043-6053.
- Nei, M. 1972. *Molecular evolutionary genetics*. New York, NY: Columbia University Press.
- Ortiz, D., Bohórquez, M. Duque., Tohme, J., Cuéllar, D. & Mosquera, V. (2012). Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59(6): 1089-1099. doi: 10.1007/s10722-011-9745
- Osorio, J., Enciso, C., Gonzalez, N., Fernández, L., Mueller, L. & Barrero, L. (2016). Association analysis for disease resistance to *Fusarium oxysporum* in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *BMC Genomics*. 17(1): 1-16.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012). GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and researchan update. *Bioinformatics*. 28(19): 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Puente, L., Pinto, C., Castro, E. & Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. *Food Res. Int.* 44(7): 1733-1740.

- Ramadán, M. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): an overview. *Food Res. Int.* 44(7): 1830–1836.
- Ruiz, X., Almanza, P., Morillo, Y., Morillo, A., Gonzales, A., Caicedo, A. & Munñoz, J. (2015) Genetic comparison from three sources of cocoa *Theobroma cacao* L. using microsatellites markers. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.* 13 (1): 10-18.
- Simbaqueba, J., Sánchez, P., Sánchez, E., Núñez, V., Chacón, M., Barrero, L. & Mariño, L. (2011). Development and characterization of microsatellite markers for the Cape Gooseberry *Physalis peruviana*. *Plos one.* 6 (10): 1-6.
- Simbaqueba, J. (2017). *Analysis of Fusarium oxysporum effectors shared between strains that infect Cape gooseberry and tomato* (Tesis de Doctorado en Ciencias de las Plantas). The Australian National University, Research School of Biology, Division of Plant Sciences, Canberra, Australia.
- Suescún, L., Betancourt, E., Marroquin, M., García, F. & Núñez, V. (2011). *Producción de plantas genéticamente puras de uchuva*. Bogotá: Cámara de Comercio de Bogotá, Novacampo, MADR, 44p.
- Takimoto, T., Kanbayashi, Y., Toyoda, T., Adachi, Y., Furuta, C., Suzuki, K., Miwa, T. & Bannai, M. (2014). 4 β -hydroxywithanolide E isolated from *Physalis pruinosa* calyx decreases inflammatory responses by inhibiting the NF-KB signaling in diabetic mouse adipose tissue. *Int. J. Obes.* 38(11): 1432-1439.
- Vargas, O., Pérez, L., Zamora, P., Rodríguez, A., (2010). Assessing genetic diversity in Mexican husk tomato species (*Physalis* L., Solanaceae). *Plant Mol. Biol. Rep.* 29(3): 733-738.
- Wei, J., Hu, X., Yang, J. & Yang, W. (2012). Identification of single-copy orthologous genes between *Physalis* and *Solanum lycopersicum* and analysis of genetic diversity in *Physalis* using molecular markers. *PLoS ONE* 7, e50164. doi: 10.1371/journal.pone.0050164

- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations*. Chicago (USA): University of Chicago Press. 566p
- Wu, S., Chang, S., Lin, D., Wang, S., Hou, F. & Ng, L. (2009) Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 47(6):1132–1138.
- Yadav, O., Mitchell, S., Zamora, A., Fulton, T. & Kresovich, S. (2007). Development of new simple sequence repeat markers for pearl millet. *Journal of SAT Agricultural Research*, 3(1), 34.
- Yañez V. (2002). Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Yen, C., Chiu, C., Chang, F., Chen, J., Hwang, C., Hseu, Y., Yang, H., Lee, A., Tsai, M. & Guo, Z. (2010). 4 -Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G 2/M arrest. *BMC cáncer*. 10(1):46. doi: 10.1186/1471-2407-10-46