



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Mapeo de la región 5s rADN mediante Hibridización
Fluorescente In Situ de poblaciones cultivadas de
Physalis peruviana L., de Cajamarca, Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biodiversidad y
Gestión de Ecosistemas

AUTOR

María Angélica SILES VALLEJOS

ASESOR

Mg. Olga Hilda BRACAMONTE GUEVARA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Siles, M. (2021). *Mapeo de la región 5s rADN mediante Hibridación Fluorescente In Situ de poblaciones cultivadas de Physalis peruviana L., de Cajamarca, Perú.* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	María Angélica Siles Vallejos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06618737
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4956-8310
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Olga Hilda Bracamonte Guevara.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06133853
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6742-4540
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Fernando Octavio Retuerto Prieto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08212301
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	José Ricardo Linares Gonzáles
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44352620
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Roxana Yanina Castañeda Sifuentes.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43020374

Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.1.2. Biodiversidad y Ecología de Ecosistemas Terrestres
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Recursos Genéticos (RECGEN)
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Genética (207) Facultad Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.0881152 Longitud: -77.0408448
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2020
URL de disciplinas OCDE	Biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.15



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 210v-UPG-FCB-2021

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIODIVERSIDAD Y GESTIÓN DE ECOSISTEMAS
(SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las 10:00 horas del día 11 de octubre de 2021, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace meet.google.com/bxp-ehbj-buu, el Jurado de Tesis conformado por:

Mg. Fernando Octavio Retuerto Prieto	(Presidente)
Dra. Roxana Yanina Castañeda Sifuentes	(Miembro)
Mg. José Ricardo Linares Gonzáles	(Miembro)
Mg. Olga Hilda Bracamonte Guevara	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biodiversidad y Gestión de Ecosistemas, que solicitara la señora Bachiller Doña **MARÍA ANGÉLICA SILES VALLEJOS**.

Después de darse lectura al **Expediente N° 210v-UPG-FCB-2021**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

“Mapeo de la región 5s rADN mediante Hibridización Fluorescente In Situ de poblaciones cultivadas de *Physalis peruviana* L., de Cajamarca, Perú”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: EXCELENTE con la nota de Diecinueve (19)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biodiversidad y Gestión de Ecosistemas, a la señora Bachiller doña **MARÍA ANGÉLICA SILES VALLEJOS.**

Siendo las 11:30 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día lunes 11 del mes de octubre del año 2021.



Firmado digitalmente por
BRACAMONTE GUEVARA Olga
Hilda FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 11.10.2021 15:46:22 -05:00

.....
Mg. Fernando O. Retuerto Prieto
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE
fretuertop@unmsm.edu.pe
RENACYT P0003078

.....
Mg. Olga H. Bracamonte Guevara
Profesora Principal D.E.
ASESORA
obracamonteg@unmsm.edu.pe
RENACYT P0000404

.....
Dra. Roxana Y. Castañeda Sifuentes
Profesora Auxiliar a T.C.
MIEMBRO
rcastanedas@unmsm.edu.pe
RENACYT P0004935

.....
Mg. José R. Linares González
Profesor Auxiliar a T.P.
MIEMBRO
jlinaresg@unmsm.edu.pe

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
Hipótesis.....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Metodología	8
Material Biológico.....	8
ANEXOS	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos geográficos in situ de las zonas de colecta por población de *Physalis peruviana* L.

Tabla 2. Mezcla de hibridación. Se muestran los valores base a partir de los cuales se hacen los cálculos de acuerdo con el número de muestras a hibridar. (Poggio et al., 2000).

Tabla 3. Número de señales 5s y su porcentaje, observadas por campo cromosómico de *P. peruviana* en las poblaciones de Celendín y San Pablo, Cajamarca, Perú.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Physalis peruviana*. A. Hábito de *Physalis peruviana*; B. Flor en vista lateral; C. Flor en vista frontal; D. Fruto inmaduro; E. Fruto maduro. (Fotos: José Roque, tomado de Dostert et.al., 2013).

Figura 2. Lugar de colecta de *Physalis peruviana*, Cajamarca, Perú. A) indica el mapa de Sudamérica, resaltando en rojo al Perú. B) señala los puntos de colecta en Celendín y San Pablo, situados en el departamento de Cajamarca.

Figura 3. Metafase somática de *P. peruviana*, población Celendín (A) y población San Pablo (B) hibridadas con la sonda 5s ADN_r, detectada con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (fluorescencia verde) y contrateñidas con DAPI. (las flechas rojas marcan las señales grandes y las flechas blancas indican las más pequeñas; la barra blanca presenta una escala de 10 μ m).

Figura 4. A) Mapeo físico del locus de ADN_r 5s en taxones de *Capsicum* silvestres y cultivados mediante FISH. (a) Cariogramas bien organizados derivados de placas de metafase somática teñidas con DAPI (azul) que muestran el número y la posición del locus de ADN_r 5s (puntos verdes) (b) Representación esquemática de los cromosomas que portan el locus de ADN_r 5s. El tamaño de los puntos verdes se relaciona con la intensidad media de fluorescencia. (Aguilera et al, 2016. doi.org/10.1590/0001-37652301620140616 B) FISH con sondas de ADN_r 5s (verde) y 45s (rojo o amarillo), en especies de *Passiflora* con $x = 6$, $x = 10$ o $x = 12$. (De Melo et al., 2003, www.aob.oupjournals.org)

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Metafases somáticas de *P. peruviana*, población Celendín, hibridadas con la sonda 5s rADN, detectada con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (fluorescencia verde) y contrateñidas con DAPI. a) 5s ADNr, b) DAPI, c) DAPI más 5s ADNr (las flechas indican la posición de las señales, la barra blanca presenta una escala de 10 μm).

ANEXO 2. Metafases somáticas de *P. peruviana*, población San Pablo, hibridadas con la sonda 5s ADNr, detectada con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (fluorescencia verde) y contrateñidas con DAPI. a) 5s ADNr, b) DAPI, c) DAPI más 5s ADNr (las flechas indican la posición de las señales, la barra blanca presenta una escala de 10 μm)

ANEXO 3. Constancia de identificación botánica de las muestras colectadas de Aguaymanto, Celendín, Cajamarca, Perú.

ANEXO 4. Constancia de identificación botánica de las muestras colectadas de Aguaymanto, San Pablo, Cajamarca, Perú.

ANEXO 5. Colecta en Celendín. A. área de cultivo B. estado de la planta y colecta.

ANEXO 6. Colecta en San Pablo. A. flor de la planta B. estado de la planta y colecta. C. campo de cultivo.

Resumen

Physalis peruviana, fruto nativo del Perú, conocida también como aguaymanto, capulí, uchuva, uvilla, ushun, entre otros; es una planta perteneciente a la familia Solanaceae cuyo centro de origen y diversificación se encuentra en los países andinos de Perú, Colombia y Ecuador, principalmente. Actualmente es de gran importancia económica en la agricultura andina por su contenido farmacológico y nutricional. En el Perú hay pocos estudios a nivel de citogenética básica no existiendo información detallada a nivel de citogenética molecular; para contribuir con información pertinente, el presente estudio identifica regiones 5s rADN utilizando la técnica de Hibridación Fluorescente In Situ – FISH, en los cromosomas de poblaciones cultivadas de San Pablo y Celendín, Cajamarca, Perú. Se han identificado 6 señales en 4 pares de cromosomas hibridados no encontrándose diferencias tanto en intensidad de brillo como en tamaño para las mismas en ambas poblaciones estudiadas lo que nos permite indicar que no se tratarían de ecotipos distintos.

Palabras clave: Aguaymanto, cromosoma, FISH, locus 5S rADN.

Abstract

Physalis peruviana, native fruit of Peru, also known as golden berry, cape gooseberry, capulí, uchuva, uvilla, ushun, among others, is a plant belonging to the Solanaceae family whose center of origin and diversification is found in the Andean countries of Peru, Colombia and Ecuador. It is currently of great economic importance in Andean agriculture due to its pharmacological and nutritional content. Although classical cytogenetics research on this berry has been conducted in Perú there is no precise evidence based on molecular cytogenetic studies. To contribute with information, the present study identifies 5s rDNA sites applied the Fluorescent In Situ Hybridization - FISH technique, in chromosomes of San Pablo and Celendín cultivated populations, Cajamarca, Perú. This research was identified the 5S rDNA locus in the two populations of Golden berry, reporting six signals in 4 pairs of chromosomes, no differences were found in the number of 5S rDNA loci also in brightness intensity and in size between both populations, so we could point out that they would not be different ecotypes.

Keywords: Golden Berry, FISH, chromosome, 5S rDNA locus.

INTRODUCCIÓN

Physalis peruviana L., es una solanácea nativa de los Andes Sudamericanos conocida como “aguaymanto”, “uchuva”, “ushun”, entre otros, que en los últimos años se ha constituido en un cultivo económicamente importante para países como Colombia y Perú. Diferentes referencias indican que fue domesticada, cultivada y muy apreciada por los antiguos peruanos (Chasquibol *et al.*, 2015, Deza *et al.*, 2018). Medina-Medrano *et al.* (2012) señalan que el centro de origen y diversificación de esta planta se ubica en los Andes Sudamericanos, principalmente de Colombia, Perú y Ecuador (Trillos *et al.*, 2008). Su fruto es una baya de color naranja – amarillo, carnosa, jugosa, de forma globosa que se encuentra protegida por un cáliz acrescente no comestible de naturaleza papirácea.

En general, no se reportan variedades definidas de la especie, pero usualmente es agrupada en ecotipos, teniendo en cuenta caracteres morfológicos de fruto, flor, entre otros (Dostert *et al.*, 2013). Se entiende como ecotipo a una subpoblación que se adapta localmente en una determinada extensión geográfica y se diferencia genéticamente permitiéndole vivir en un ambiente particular o en un ecosistema definido de acuerdo a las condiciones propias del lugar (González & Rojas, 2014). En *Physalis peruviana* se tiene determinado 3 ecotipos claramente diferenciados por sus caracteres morfológicos, que son los ecotipos Kenia, Sudáfrica y Colombia, los que llevan el nombre del lugar de procedencia, y son los que se cultivan con mayor frecuencia en el mundo; aunque existen referencias de más de 80 ecotipos descritos a nivel mundial (Dostert *et al.*, 2013; Puente *et al.*, 2011, Rodríguez *et al.*, 2006).

En el Perú hay pocos estudios de identificación genética de la especie a pesar de ser centro de origen y diversificación; entre estos, pueden mencionarse los estudios a nivel de proteínas seminales (Bonilla *et al.*, 2019), o de recuento cromosómico (Escobar, 2016) así como la caracterización citogenética de 3 ecotipos de Cajamarca (Carbajal, *et al.*, 2021). Aunque la mayoría de los estudios están enfocados a la identificación de ecotipos o poblaciones teniendo en cuenta caracteres agronómicos y morfológicos; podemos encontrar algunos estudios de citogenética clásica que evalúan el número y morfología cromosómica de ecotipos Colombia o Kenia, principalmente en otros países, como Colombia; en algunos casos mencionan el estudio de poblaciones de origen peruano, pero no especifican la región de procedencia del ecotipo analizado; tenemos también que diversos autores han encontrado, variabilidad tanto en el conteo cromosómico como en

la morfología de los cromosomas encontrándose cariotipos con dotaciones cromosómicas de $2n = 48$ y $2n = 24$ (Liberato *et al.*, 2014, Rodríguez *et al.*, 2006). Carbajal *et al.* (2021) estudió poblaciones de Cajamarca, Perú, reportando una dotación cromosómica $2n = 48$, adicionalmente evidenció presencia de aneuploidía somática en sus poblaciones analizadas observando células con $2n = 24, 46, 50, 52, 62, 80$ y 82 . Por otro lado, autores como Rodríguez *et al.* (2006) mencionan que debido al nivel de ploidía esperado de $4X$, no puede establecerse cariotipos a partir de grupos de homólogos de 4 cromosomas utilizando las técnicas de citogenética clásica, siendo muchas veces imposible la construcción de un cariotipo que caracterice a un ecotipo determinado (Rodríguez *et al.*, 2006).

La *hibridación fluorescente in situ*, FISH por sus siglas en inglés, es una poderosa técnica muy utilizada en citogenética de plantas; se basa en interacciones moleculares específicas entre el ADN cromosómico y otra secuencia a la que se denomina “sonda”, la cual ha sido marcada previamente con un fluorocromo específico y es utilizada para identificar regiones de ADN tanto en cromosomas individuales como en genomas completos lo que a su vez permite identificar cromosomas homólogos, análisis filogenéticos, mapeos físicos de determinadas secuencias, estudio de procesos evolutivos, entre muchas otras aplicaciones (Setiawan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2016; Gomez-Rodriguez *et al.*, 2013; Bolaños-Herrera *et al.*, 2009).

En el caso de aguaymanto, no se reportan estudios de citogenética molecular, pero sí en otras especies pertenecientes a la familia Solanaceae (Aguilera *et al.*, 2016). El presente trabajo tiene el objetivo de identificar el número de señales marcadas para el locus 5s rADN en el conjunto de cromosomas de *Physalis peruviana*, aguaymanto, en las poblaciones de San Pablo y Celendín procedentes de la región de Cajamarca, Perú, utilizando la técnica de *hibridación fluorescente in situ*, lo que podrá servir como punto de partida para discernir si efectivamente se tratan de dos ecotipos diferentes como señalan sus productores refiriéndose como ecotipos Agroandino y Celendino respectivamente.

ANTECEDENTES

La familia Solanaceae tiene una distribución cosmopolita, incluye unos 100 géneros y 2,500 especies con una gran diversidad de hábito, morfología y ecología. La mayor diversidad se encuentra en América del Sur y América Central. (Anguiano-Constante *et al.*, 2018) En el Perú, la familia es una de las más ricas en la flora, reconociéndose alrededor de 42 géneros y 600 especies; se reconocen 208 especies y 6 variedades como endémicas, en 16 géneros, ocupando el sexto lugar por su diversidad en especies endémicas (Knapp *et al.*, 2006).

El género *Physalis* es uno de los más numerosos de las Solanaceae y comprende entre 75 a 120 especies. Se distribuye principalmente en el Neotrópico, habiendo solo unas pocas especies en Eurasia y el sudeste asiático (Feng *et al.*, 2020, Medina-Medrano *et al.*, 2012) Se trata de una especie nativa de los países andinos Perú, Colombia, Ecuador y Bolivia (Fisher *et al.*, 2005)

Medina-Medrano *et al.* (2012) señalan que el centro de origen y diversificación de esta especie se ubica en los Andes Sudamericanos, principalmente de Colombia, Perú y Ecuador (Trillos *et al.*, 2008). Se trata de un arbusto perenne, de 45 – 90 cm de alto, con tallo erecto poco ramificado, cilíndrico y densamente pubescente, cuya raíz principal alcanza la profundidad de 50-80 cm. (Dostert *et al.*, 2013). Fischer *et al.* (2014) señalan que la planta crece inicialmente en forma herbácea, y a partir del segundo año forma un arbusto perenne y semileñoso siendo sus hojas simples, alternas, acorazonadas y pubescentes con un tamaño entre 5 y 15 cm de largo y 4 a 10 cm de ancho; presenta un hábito de crecimiento indeterminado, por lo cual el desarrollo de nuevas ramas, hojas y flores ocurre simultáneamente. Su fruto es una baya acrescente de color naranja – amarillo, carnosa, jugosa, de forma globosa que se encuentra protegida por un cáliz no comestible de naturaleza papirácea. Se caracteriza por su sabor agridulce, con un alto valor nutricional, que incluye carbohidratos (19,6 g/100 g) como fructosa, sacarosa y polisacáridos (celulosa, almidón, hemicelulosa y pectina); proteínas (0,05-0,3 g/100 g), lípidos (0,150,2 g/100 g), fósforo, calcio, hierro, potasio, ácido ascórbico, β -caroteno, provitamina A y complejos de vitamina B. (Chasquibol *et al.*, 2015, Reyes-Beltrán *et al.*, 2015) (Fig. 1)

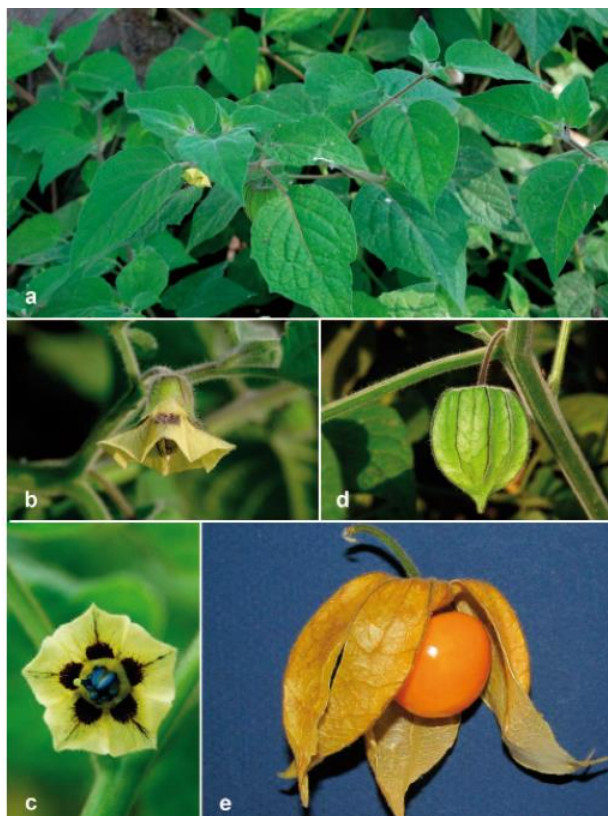


Figura 1. *Physalis peruviana*. **A.** Hábito de *Physalis peruviana*; **B.** Flor en vista lateral; **C.** Flor en vista frontal; **D.** Fruto inmaduro; **E.** Fruto maduro. (Fotos: José Roque, tomado de Dostert *et.al.*, 2013).

Por sus condiciones edafológicas, Perú se ha convertido en uno de los principales centros de cultivo y producción de bayas, destacando entre ellos el aguaymanto como cultivo nativo. Actualmente su cultivo se desarrolla mayoritariamente en la sierra del Perú (Cusco, Huánuco, Ayacucho, Junín y Cajamarca); sin embargo, también se presenta en la costa y en la selva (Carbajal, 2018)

En el caso de aguaymanto, las distintas investigaciones realizadas han permitido avanzar en el conocimiento de la variabilidad presente, incluyendo los procesos de caracterización del germoplasma a escala morfo-agronómica para atributos vegetativos y de fruto y a nivel molecular, lo que ha permitido reportar cambios en la forma del fruto, forma y color de la semilla, así como variables mínimas de descripción agronómicas, tamaño de fruto, tiempo de floración, entre otros (Herrera *et al.*, 2012; Trillos *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2005)

Hasta el momento, los estudios sobre diversidad genética de aguaymanto han sido desarrollados fundamentalmente en Colombia, país que lidera la gran demanda internacional de aguaymanto, con 20 años de experiencia en el manejo del cultivo. Colombia cuenta con numerosas accesiones del género *Physalis* en los bancos de germoplasma de Corpoica y de varias universidades (Fisher, 2014). El fruto de la forma colombiana se caracteriza por ser más pequeño con respecto al de los otros ecotipos, tiene un peso promedio de 5 gramos, un contenido de azúcar más alto que las otras formas, así como una coloración más intensa (Schreiber, 2012)

Hasta hoy en día, no se han reportado variedades propiamente dichas en los grandes países productores tales como Colombia y Sudáfrica, sólo se conocen ecotipos o plantas procedentes de diferentes países que se diferencian en tamaño de la planta, sabor del fruto, tamaño del cáliz, si la planta es erguida o rastrera, entre otros aspectos (Dostert *et al.*, 2013). Hasta el 2006, se habrían referenciado más de 80 ecotipos a nivel mundial, diferenciables por el porte de la planta, la forma del cáliz, el tamaño, el color y el sabor del fruto (Rodríguez & Bueno, 2006). Entendemos como ecotipo a una subpoblación de una especie determinada que se diferencia genéticamente y habita en forma restringida en un medio restringido adaptándose a sus condiciones ambientales particulares (González *et al.*, 2014).

En *Physalis peruviana* se acepta, en forma general, la determinación de 3 ecotipos diferenciados por sus caracteres morfológicos: los ecotipos Kenia, Sudáfrica y Colombia, que llevan el nombre del lugar de procedencia, y son los más frecuentemente cultivados en el mundo, aunque existen referencias de más de 80 ecotipos descritos a nivel mundial (Dostert *et al.*, 2013; Puente *et al.*, 2011, Rodríguez *et al.*, 2006). En el Perú, Dostert *et al.* (2013) mencionan la existencia de 4 ecotipos provenientes de Cajamarca, referenciados en el Museo de Historia Natural, herbario USM; asimismo, se señala a Cajamarca como el departamento con la mayor área cultivada de aguaymanto (Bonilla *et al.*, 2019).

Estas evidencias permiten considerar a la región de Cajamarca como uno de los principales centros de diversidad genética de aguaymanto en nuestro país. Sin embargo, en el país hay pocos estudios de identificación genética de la especie a pesar de ser centro de origen y diversificación; entre estos, pueden mencionarse los estudios a nivel de proteínas seminales (Bonilla *et al.* 2019), o de recuento cromosómico (Escobar, 2016) así como la caracterización citogenética de 3 ecotipos de Cajamarca (Carbajal, 2018). La

mayoría de los estudios están enfocados a la identificación de ecotipos o poblaciones teniendo en cuenta caracteres agronómicos y morfológicos. Aun así, en *Physalis peruviana* existen algunos estudios de citogenética clásica que evalúan el número y morfología cromosómica de ecotipos Colombia o Kenia; en algunos casos mencionan el estudio de poblaciones de origen peruano, pero no especifican la región de procedencia del ecotipo analizado; tenemos también que diversos autores han encontrado un número variable de cromosomas, así como en morfología cromosómica, encontrándose cariotipos con dotaciones cromosómicas de $2n = 48$ y $2n = 24$ (Liberato *et al.*, 2014, Rodríguez *et al.*, 2006). Carbajal (2018) estudió poblaciones cultivadas de Cajamarca, Perú, reportando una dotación cromosómica $2n = 48$, adicionalmente evidenció presencia de aneuploidía somática en las poblaciones analizadas observando células con $2n = 24, 46, 50, 52, 62, 80$ y 82 . Por otro lado, autores como Rodríguez *et al.* (2006) mencionan que debido al nivel de ploidía esperado de $4X$, no puede establecerse cariotipos a partir de grupos de homólogos de 4 cromosomas utilizando las técnicas de citogenética clásica, siendo muchas veces imposible la construcción de un cariotipo que caracterice a un ecotipo determinado (Rodríguez *et al.*, 2006).

La *hibridización fluorescente in situ* (FISH) es una poderosa técnica muy utilizada en citogenética de plantas; se basa en interacciones moleculares específicas entre el ADN cromosómico y otra secuencia a la que se denomina “sonda”, la cual ha sido marcada previamente con un fluorocromo específico. Para detectar la posición de la sonda en los cromosomas, se realiza una contratinción mediante DAPI o yoduro de propidio, los cuales se excitan con un rango de longitud de onda de luz específica permitiendo que los cromosomas emitan una fluorescencia azul o roja (Zhang *et al.*, 2016; Gomez-Rodriguez *et al.*, 2013; Bolaños-Herrera *et al.*, 2009). Con más de 30 años de desarrollo, sus numerosas variantes y refinamientos le dan actualidad y utilidad en la caracterización de especies o líneas de cultivo, permitiendo estudios relacionados a estructura, mutación y evolución tanto de cromosomas individuales como de genomas completos (Jiang, 2019, Garcia *et al.*, 2017).

Los genes de ADN ribosomal (ADNr) son los más utilizados como sondas en los estudios de citogenética molecular debido a que contribuyen con información sobre homología entre segmentos cromosómicos, así como por ser secuencias altamente conservadas, tal es el caso de los genes 5s y 45s los que se constituyen en excelentes marcadores moleculares para un amplio grupo de especies vegetales (Garcia *et al.*, 2017;

Fukushima *et al.*, 2011; Muravenko *et al.*, 2004). El gen 5s ADNr se organiza en uno o varios loci, dispuestos en repeticiones en tándem de mil a cientos de miles de copias por genoma, cada copia comprende una región de codificación de aproximadamente 120 pares de bases (pb), que además es altamente conservada, así como un espaciador intergénico no codificante de 100 a 900 pb (Gomez-Rodriguez *et al.*, 2013, Cloix *et al.*, 2002). La identificación en posición de estos genes en los cromosomas y el número de loci presentes, posibilita la caracterización de cromosomas y genomas, ayudando así a la caracterización a nivel citomolecular del germoplasma; esto a su vez, permite evaluar la variabilidad inter e intraespecífica, lo cual también servirá para un posterior análisis evolutivo a nivel cariotípico entre especies genéticamente relacionadas (Yagi *et al.*, 2015).

En el caso de aguaymanto, no se reportan estudios de citogenética molecular, pero sí en otras especies pertenecientes a las Solanaceae (Aguilera *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta la carencia de estudios a nivel citomolecular en la especie, encontramos que resulta necesario llevar a cabo un análisis que permita identificar la presencia o ausencia de diferencias a nivel de citogenética molecular de aquellos ecotipos o poblaciones que ya han sido descritos en base a caracteres agronómicos y cromosómicos básicos. El presente trabajo tiene el objetivo de identificar el número de señales marcadas para el locus 5s ADNr en el conjunto de cromosomas de *Physalis peruviana*, aguaymanto, en las poblaciones de San Pablo y Celendín procedentes de la región de Cajamarca, Perú, utilizando la técnica de *hibridización fluorescente in situ*, lo que podrá servir como punto de partida para discernir si efectivamente se tratan de dos ecotipos diferentes como señalan sus productores refiriéndose como ecotipos Agroandino y Celendino respectivamente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Es posible caracterizar y diferenciar poblaciones de *P. peruviana* de la región de Cajamarca mediante el empleo de los marcadores ribosomales 5s ADNr.

Objetivo General

Caracterizar mediante citogenética molecular poblaciones cultivadas de *P. peruviana* de 2 regiones de Cajamarca utilizando sondas para el locus 5s ADNr.

Objetivos Específicos

- Identificar el locus 5s ADNr en los cromosomas de *P. peruviana* de las poblaciones de San Pablo y Celendín, Cajamarca, mediante FISH.
- Diferenciar poblaciones de *P. peruviana* de las poblaciones de San Pablo y Celendín, Cajamarca, mediante el locus 5s ADNr.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Material Biológico

Se colectaron 10 frutos maduros por cada planta a partir de 10 plantas de aguaymanto, de poblaciones cultivadas en las Provincias de San Pablo y Celendín, del departamento de Cajamarca-Perú (Fig. 2, Tabla 1). Los frutos fueron colocados en envases de plástico transparente, con tapa y orificios en la misma que permiten la circulación del aire, para su traslado al laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM). Las muestras herborizadas de cada población fueron entregadas al Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (MHN-USM) para su identificación taxonómica (Códigos: 222-USM-2015, 223-USM-2015). Las semillas fueron retiradas de los frutos y almacenadas en tubos de polipropileno a 4°C, para su posterior utilización (Carbajal, 2018)

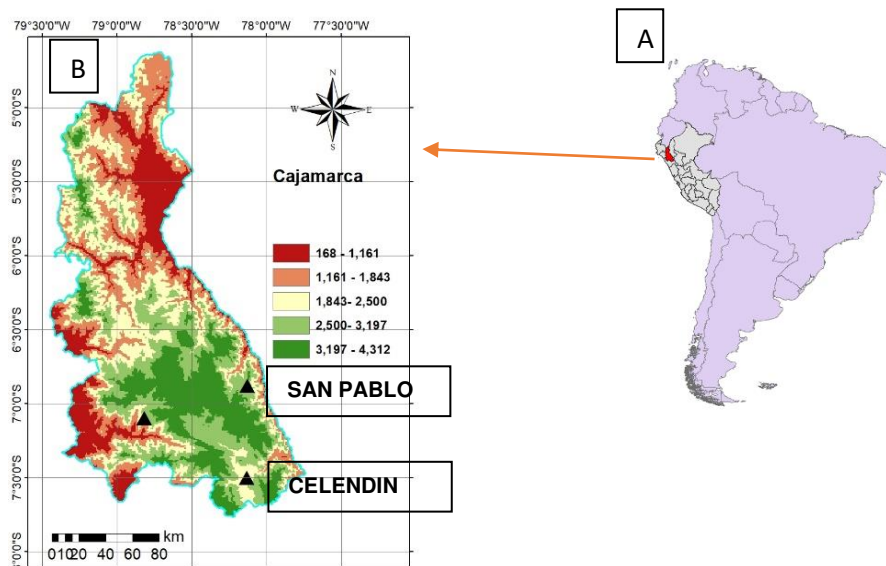


Figura 2. Lugar de colecta de *Physalis peruviana*, Cajamarca, Perú. A) indica el mapa de Sudamérica, resaltando en rojo al Perú. B) señala los puntos de colecta en Celendín y San Pablo, situados en el departamento de Cajamarca.

Tabla 1. Datos geográficos *in situ* de las zonas de colecta por población de *Physalis peruviana*.

POBLACIÓN	UBICACIÓN		ALTURA (msnm)	COORDENADAS	
	Provincia	Distrito		Latitud	Longitud
San Pablo	San Pablo	Tumbadén	2662	S°7° 5'43.9"	O°78°49'13.9"
Celendín	Celendín	Celendín Caserío de Santa Rosa	2620	S°6°52'35.9''	O°78°07'49"

Germinación de semillas y tratamiento de las raíces

Para la germinación de las semillas se siguió el protocolo establecido por Carbajal (2018) con algunas modificaciones: las semillas previamente colectadas y guardadas en tubos de polipropileno a 4°C, se siembran sobre papel filtro humedecido con agua destilada en placas Petri a temperatura ambiente (22° - 28°C), Las raíces de 1 a 2 cm de longitud se colectan, entre las 10 y 12 de la mañana, hora de corte estandarizada por trabajos previos (Carbajal, 2018), son inmediatamente sometidas a un pre-tratamiento con Colchicina al 0.025% por 1h 20 minutos a temperatura ambiente (entre 22° - 25°C) y en oscuridad; seguido de una hipotonización en agua destilada por 60 minutos a 37°C. Finalmente, el tejido fue fijado en una solución etanol: ácido acético (3:1) durante 24 horas a 8 °C, hasta su posterior uso. Se seleccionarán placas pro-metafásicas y metafásicas con cromosomas lo suficientemente separados como para identificar las señales FISH.

Obtención de la sonda 5s ADNr

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990) con algunas modificaciones. Se amplificó la región 5S ADNr a partir de los primers pr5S14 (5'-GGCGAGAGTAGTACTAGGATCCGTGAC-3') y pr5S15 (5'-GCTTAACTTCGGAGTTCTGA TGGGA-3') reportado por Volkov *et al.*, (2001), con las siguientes condiciones de PCR: Buffer de PCR 1X, MgCl 1.5 mM, dNTPs 0.2 µM, 0.2 µM de cada primer, 1 U de Taq polimerasa y 30 ng de ADN genómico, en un volumen de reacción de 20 µl; llevado a un programa de 95 °C por 9 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y de 72 °C por 60 segundos, y una extensión final de 72 °C por 4 minutos. Después, el amplicón 5s ADNr fue marcado con

moléculas de biotina mediante la técnica molecular del Nick Translation, utilizándose el kit comercial DIG-Nick Translation Mix de ROCHE, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de cromosomas vegetales a partir de ápices radicales

Se realizó la germinación de las semillas siguiendo el protocolo establecido por Carbajal (2018) con algunas modificaciones: las semillas se sembraron sobre papel filtro humedecido con agua destilada en placas Petri a temperatura ambiente (22°-28°C), manteniendo siempre la humedad del papel filtro. Las raíces de 1 a 2 cm de longitud fueron colectadas, entre las 10 y 12 de la mañana e inmediatamente sometidas a un pre-tratamiento con Colchicina al 0.025% por 1h 20 minutos a temperatura ambiente (entre 22° - 25°C) y en oscuridad; seguido de una hipotonización en agua destilada por 60 minutos a 37°C. Después, el tejido fue fijado en una solución etanol: ácido acético (3:1) durante 24 horas a 8 °C, hasta su posterior uso. Posteriormente para la preparación de placas metafásicas se tuvo en cuenta los protocolos reportados por Aliyeva-Schnorr *et al.* (2015) y Aguilera *et al.* (2016), siendo las raíces fijadas lavadas en agua destilada fría dos veces por 5 minutos cada vez, seguido de dos lavados en buffer citrato (0,01 M a pH 4.6) por 5 minutos cada vez. Luego, las raíces se transfirieron a una solución enzimática que contenía celulasa al 2% (de *Aspergillus niger*, Sigma) y pectinasa al 10% (de *Aspergillus niger*, Sigma), disueltas en 40% de glicerol en buffer citrato, durante 1 hora a 37°C. Después, las raíces se enjuagaron dos veces por 10 minutos cada vez con buffer citrato y dos veces en etanol a 90° por cinco segundos, con agitación en cada enjuague. Seguidamente se colocó la punta de la raíz en una gota de ácido acético al 45% sobre una lámina, se cubrió con una laminilla y se realizó la técnica del “squash”. Las láminas elaboradas se observaron en un microscopio con contraste de fase (Zeiss-PrimoStar), seleccionándose aquellas que presentaron metafases con cromosomas adecuadamente separados. Luego se levantó la laminilla con ayuda de hielo seco y un bisturí. Finalmente, las láminas se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C sumergidas en etanol absoluto hasta su uso.

Hibridización Fluorescente In Situ (FISH)

Se siguió el protocolo para FISH reportado por Poggio *et al.* (2000), el cual consta de las siguientes etapas:

a) Hibridación de las sondas para el locus 5s rADN

Las láminas que contienen los preparados cromosómicos se incubaron en 100 mg/ml de ARNasa libre de ADNasa en 2x SSC durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda y se lavaron tres veces en 2x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez. Luego, las láminas se fijaron en paraformaldehído al 4% (p/v) recién preparado durante 10 minutos, se lavaron en 2x SSC durante 15 minutos, se deshidrataron en una serie graduada de etanol (80°, 90°, etanol absoluto) y se secaron a temperatura ambiente por 2 horas. La solución de hibridación contuvo 50% (v/v) de formamida desionizada, 10% (p/v) sulfato de dextrano (de un stock que está al 50% por lo que diluimos en 6/30 por 5 veces), 0,3% SDS y 0,3 mg/ml de ADN de esperma de salmón en 2x SSC, seguido de la adición de 50 ng de sonda marcada, a un volumen total de 30 mL de mezcla de hibridación para cada lámina (Tabla 2).

Tabla 2. Mezcla de hibridación. Se muestran los valores base a partir de los cuales se hacen los cálculos de acuerdo con el número de muestras a hibridar. (Poggio *et al.*, 2000).

Solución	Cantidad a preparar (uL)	Concentración Final
Formamida	15	50%
Sulfato de Dextrano	6	10%
20x SSC	3	2x
Sonda (5s rADN)	50 ng	50 ng/30ul
ADN Salmón 10mg/ml	1	0,3 mg/ml
SDS 10%	1	0,3%
Agua	Y	
Volumen TOTAL	30 uL	

La mezcla de hibridación se desnaturalizó durante 15 minutos a 75°C y se colocó sobre las láminas que contenían las preparaciones cromosómicas. Después, estas láminas se

colocaron en un hibridizador BIOBASE modelo HS-500, por 7 minutos a 75°C, 5 minutos a 55°C, 5 minutos a 45°C y finalmente, a 37°C por 12 horas.

b) Lavados post hibridación y detección de la sonda

Después de la hibridación, se colocaron las láminas en 2x SSC a 42°C durante 5 min; luego se lavaron rigurosamente en formamida al 20% en 0.1x SSC a 42°C durante 10 min. Siguió un lavado en 0,1x SSC a 42°C por 5 minutos; 2x SSC por 5 min a 42°C, se transfirieron a un buffer de detección (4x SSC, Tween 20 al 0,2% (v/v)) por 5 min a 42°C y por 5 min a temperatura ambiente.

Para detectar la sonda marcada con Biotina, las láminas se trataron con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (Invitrogen™), que da la fluorescencia verde. Con lo mencionado anteriormente, las láminas se trataron con BSA al 2,5% (p/v) en buffer de detección por 3 minutos y luego se incubaron en una solución que contenga 10ug/mL del conjugado descrito anteriormente, disuelto en BSA al 2,5% (p/v) en buffer de detección durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Posteriormente, se lavaron 3 veces en buffer de detección por 10 minutos a temperatura ambiente y también en oscuridad.

c) Tinción con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y montaje

Las láminas se contrastaron agregando 20 ul de SlowFade Gold Antifade (Invitrogen™), solución que contiene 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y antifade (medio de montaje que retarda el decaimiento de la fluorescencia); las láminas se dejaron durante 12 horas en oscuridad y a temperatura ambiente antes de su observación.

Las láminas se examinaron en un microscopio de epifluorescencia con cámara fotográfica incorporada (Zeiss, Scope A1) para observar los cromosomas y la hibridación de la sonda con los filtros correspondientes para cada fluorocromo, tomando fotos cada vez que se cambió el filtro.

d) Análisis de imágenes

Para poder evidenciar la hibridación de la sonda en los cromosomas se realizó la sobreposición de las fotos utilizando el programa GIMP 2.10 (www.gimp.org.es) que es un software de libre circulación.

Resultados y Discusión

Identificación de la región 5s ADNr en los cromosomas mediante FISH

Physalis peruviana L tiene un número cromosómico de $2n=42$ cromosomas, aunque diversos autores han reportado un número variable de cromosomas, así como en su morfología cromosómica, encontrándose cariotipos con dotaciones cromosómicas de $2n = 48$ y $2n = 24$ (Liberato *et al.*, 2014, Rodríguez *et al.*, 2006). En Perú, Carbajal (2018) estudió poblaciones cultivadas de San Pablo, Celendín y Cajabamba en Cajamarca, reportando una dotación cromosómica $2n = 48$ para los 3 ecotipos, lo que coincide con el nivel de ploidía esperado de $2n=4x=48$, aunque no pudo elaborarse un cariotipo con grupos de homólogos con cuatro cromosomas y sugiere complementar la información con el número y la morfología basándose en estudios sobre estructura interna, la que puede obtenerse con la utilización de técnicas de citogenética molecular como DAPI, CMA3 o FISH.

Los genes de ADN ribosomal (ADNr) son los más utilizados como sondas en los estudios de citogenética molecular, debido a que contribuyen con información sobre homología entre segmentos cromosómicos, así como por ser secuencias altamente conservadas, tal es el caso de los genes 5s y 45s los que se constituyen en excelentes marcadores moleculares para un amplio grupo de especies vegetales (Jiang, 2019; Garcia *et al.*, 2017; Fukushima *et al.*, 2011; Muravenko *et al.*, 2004). La identificación de la posición de estos genes en los cromosomas y el número de loci presentes, posibilita la caracterización de cromosomas y genomas, ayudando así a la caracterización a nivel citomolecular del germoplasma; esto a su vez, permite evaluar la variabilidad inter e intraespecífica, lo cual también servirá para un posterior análisis evolutivo a nivel cariotípico entre especies genéticamente relacionadas (Yagi *et al.*, 2015).

En este trabajo, se ha utilizado el marcaje del locus 5s ADNr mediante la técnica de FISH, técnica de gran actualidad y utilidad en la caracterización de especies o líneas de cultivo, que permiten diversos estudios relacionados a estructura, mutación y evolución tanto de cromosomas individuales como de genomas completos (Jiang, 2019, Garcia *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en las preparaciones cromosómicas de *P. peruviana* con la sonda ADNr utilizada, permiten establecer el locus 5s ADNr en los cromosomas del complemento de las 2 poblaciones de aguaymanto analizadas. Se evaluaron un total de 20 campos por población, detectándose 6 señales fluorescentes de color verde en 3 pares

de cromosomas hibridados diferentes para ambas poblaciones, en el 86,6% de campos analizados para Celendín y de 80% para San Pablo; en tanto que se evidencia un porcentaje menor de 13,4% para Celendín y de 20% para San Pablo que muestra 4 señales. De las 6 señales observadas en los cromosomas hibridados para ambas poblaciones, 4 de ellas son fácilmente visibles por su tamaño y brillo y 2 de ellas se ven más pequeñas y con un brillo de menor intensidad (Fig.3, a y b; Tabla 3), se puede argumentar que un mayor tamaño e intensidad de brillo de la señal indicaría un mayor número de copias del gen 5s ADNr en esos sitios, así como un menor tamaño y menor intensidad de brillo se debe a un menor número de copias del gen (Aguilera *et al.*, 2016; Moscone *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2005); Aguilera *et al.* (2016) en sus estudios en *Capsicum* encuentra señales con tamaño y brillo semejante en los taxa estudiados sugiriendo para las mismas un número de copias ribosomales semejantes, sin embargo, en nuestro caso, habría que ampliar las zonas de estudio en nuestro país para corroborar esto.

Observamos que para ambas poblaciones el locus se mapea en posición intercalar, casi distal, en los brazos cromosómicos, aunque de momento no es posible precisar tamaño y morfología de los brazos; se sabe que el locus 5s ADNr con sus secuencias repetidas en tándem suele ubicarse en cualquier parte del genoma, aunque usualmente lo hace cerca de las regiones teloméricas o centroméricas (Liu *et al.*, 2010), es así como en *Capsicum* (Solanaceae), el locus se encuentra en posición intercalar cerca al telómero del brazo corto del cromosoma que lo porta, en tanto que en *Passiflora* se muestra en posición subterminal (Aguilera *et al.*, 2016; De Melo *et al.*, 2003). Estas evidencias encontradas en otras especies, tanto de la misma familia que aguaymanto como en otras familias, coinciden con nuestras observaciones.

Tabla 3: Número de señales 5s y su porcentaje, observadas por campo cromosómico de *P. peruviana* en las poblaciones de Celendín y San Pablo, Cajamarca, Perú.

	<i>Población</i>	
<i>Campos con</i>	Celendín	San Pablo
6 señales	16 (86.6%)	14 (80%)
4 señales	4 (13,4 %)	6 (20%)
TOTAL	20	20

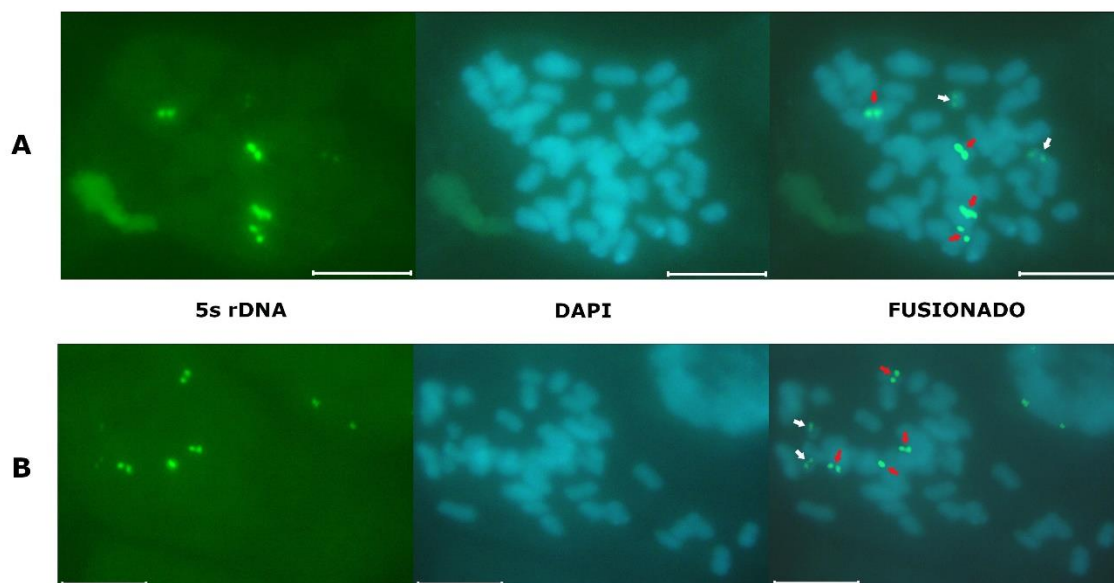


Figura 3. Metafase somática de *P. peruviana*, población Celendín (A) y población San Pablo (B) hibridadas con la sonda 5s ADN_r, detectada con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (fluorescencia verde) y contrateñidas con DAPI. (las flechas rojas marcan las señales grandes y las flechas blancas indican las más pequeñas; la barra blanca presenta una escala de 10 μ m)

La constancia que se observa en el número de señales presentes en los 3 pares de cromosomas hibridados sugiere que los sitios para el locus serían relativamente estables. Aguilera *et al* (2016) indica que en *Capsicum* suele encontrarse un locus 5s simple por genoma haploide para los taxa diploides (Fig 4A) y loci doble en taxa poliploides; sin embargo, se ha visto que en otros géneros, como *Passiflora*, todos los diploides presentan 2 cromosomas marcados, los tetraploides presentan 4 cromosomas marcados y los hexaploides 6 cromosomas marcados (Fig 4B), indicando así que el

número de sitios guarda una clara relación con el nivel de ploidía (De Melo *et al.*, 2003).

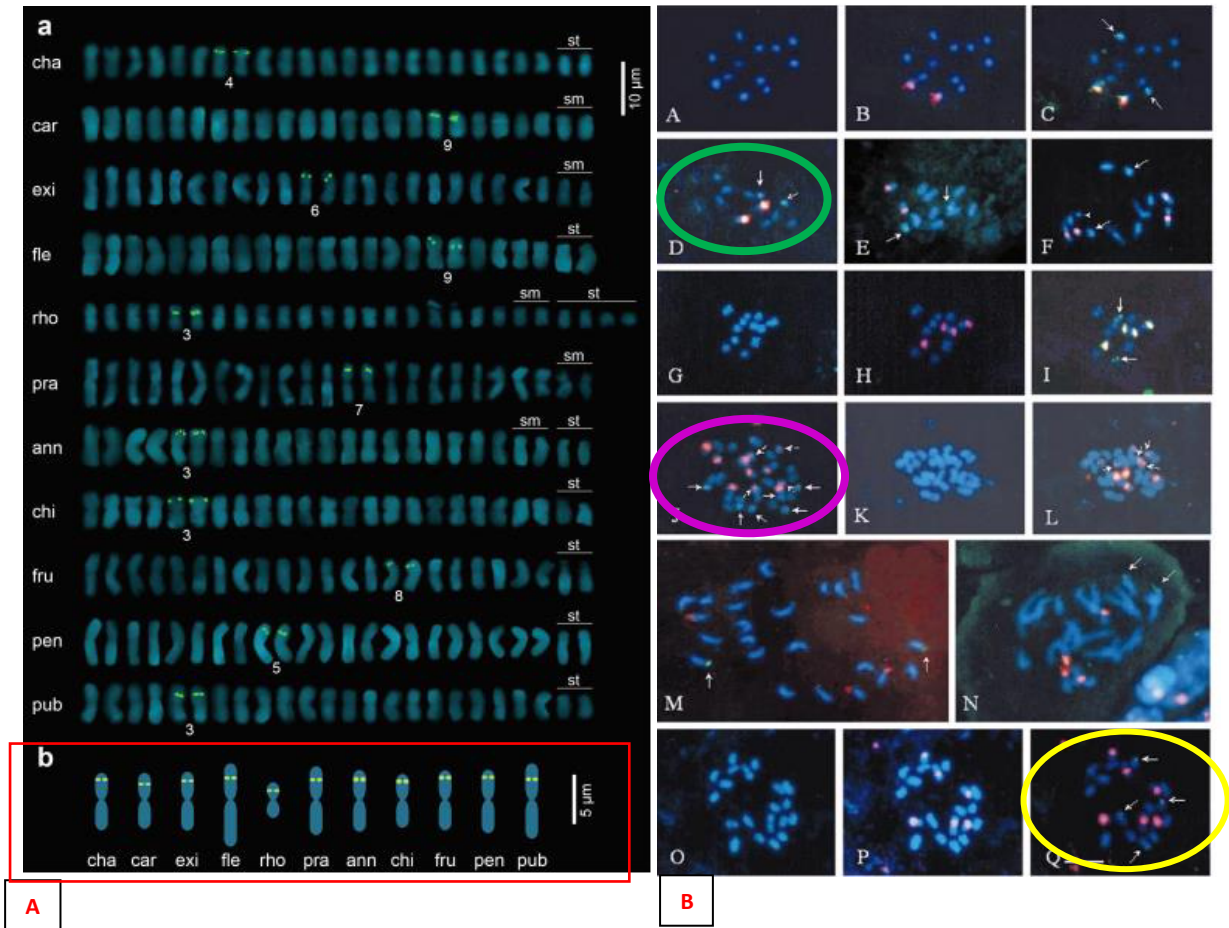


Figura 4. A) Mapeo físico del locus de ADNr 5s en taxones de *Capsicum* silvestres y cultivados mediante FISH. (a) Cariogramas bien organizados derivados de placas de metafase somática teñidas con DAPI (azul) que muestran el número y la posición del locus de ADNr 5s (puntos verdes) (b) Representación esquemática de los cromosomas que portan el locus de ADNr 5s. El tamaño de los puntos verdes se relaciona con la intensidad media de fluorescencia. (Aguilera *et al.*, 2016. doi.org/10.1590/0001-37652301620140616) **B)** FISH con sondas de ADNr 5s (verde) y 45s (rojo o amarillo), en especies de *Passiflora* con $x = 6$, $x = 10$ o $x = 12$. (De Melo *et al.*, 2003, www.aob.oupjournals.org)

En el presente estudio, el número de señales observadas en ambas poblaciones estudiadas indicaría que se estaría ante una especie poliploide ($2n= 48$; $x=12$), si bien es cierto no se puede precisar de qué poliploide se trataría, debido a que no se ha podido establecer aún un cariotipo con ordenamiento de homólogos de 4 o 6 cromosomas con las técnicas de citogenética clásica (Rodríguez *et al.*, 2006; Carbajal *et al.*, 2021) a causa del tamaño pequeño y la morfología similar de los cromosomas. Igualmente, habría que tener en cuenta que siendo el número básico para la especie de $x=12$ cromosomas, para afirmar la presencia de hexaploidía deberíamos contar 72 cromosomas y no 48, que es el número total de cromosomas que encontramos.

No hay reportes sobre estudios en identificación del locus 5s ADNr en aguaymanto por lo que el presente sería el primero. En el estudio, no se observa diferencias en cuanto a número, tamaño de las señales, e intensidad del brillo con la que se marca el locus en los diferentes cromosomas, teniendo que es muy semejante en ambas poblaciones: 4 señales grandes y 2 más pequeñas en cada complemento; esta semejanza en las señales avalaría la idea de que las poblaciones de Celendín y San Pablo no corresponderían aún a ecotipos diferenciados, lo que va de acuerdo con lo mencionado por Bonilla *et al.* (2019) en el que se reporta que no existe diversidad genética entre las poblaciones de Celendín y San Pablo; los mismos autores señalan que es de conocimiento general que las poblaciones estructuradas presentan bajos niveles de diversidad genética y que este tipo de poblaciones es característico en poblaciones cultivadas, como es también en nuestro caso, dado que la colecta de las muestras trabajadas también se hicieron en campos cultivados con un programa de mejoramiento genético por selección masal (Bonilla *et al.*, 2019)

Conclusiones

El número de señales 5s ADNr y su ubicación en los cromosomas constituyen un marcador citogenético molecular que puede identificar la diversidad presente en las poblaciones estudiadas.

Se reporta por primera vez un estudio de identificación del locus 5s ADNr en los complementos cromosómicos para las poblaciones de Celendín y San Pablo de *Physalis peruviana* procedentes del departamento de Cajamarca, encontrándose 6 regiones marcadas, 4 grandes y 2 pequeñas, en 3 pares de cromosomas para ambas poblaciones.

En el caso de San Pablo y Celendín, Cajamarca, Perú, no es posible diferenciar las poblaciones mediante el marcaje con la sonda 5s ADNr por lo que no se tratarían de ecotipos diferentes.

Sugerencias

Se sugiere continuar con los estudios de mapeo físico del locus 5s ADNr en poblaciones silvestres y cultivadas de *P. peruviana* en Cajamarca, establecer los cariotipos marcados 5s y así poder diferenciar los distintos ecotipos y sentar las bases para posteriores estudios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, Patricia M., Debat, Humberto J., Scaldaferrro, Marisel A., Marti, Dardo A., & Grabiele, Mauro. (2016). FISH-mapping of the 5S rDNA locus in chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(1), 117-125.
- Aliyeva-Schnorr, L., Ma, L., & Houben, A. (2015). A Fast Air-dry Dropping Chromosome Preparation Method Suitable for FISH in Plants. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (106), e53470.
- Carbajal Gonzales, YN (2018). Caracterización citogenética de tres ecotipos de *Physalis peruviana* “Aguaymanto” provenientes del departamento de Cajamarca: Diversidad y evolución. Tesis para optar el Grado de Bachiller. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Carbajal González, YN.; Bonilla, H.; Siles-Vallejos, M.; Lòpez, A. (2021). Citogenética comparativa de *Physalis peruviana* en tres poblaciones cultivadas de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 28. <https://doi.org/doi:10.15381/rpb.v28i2.20462>
- Cloix C, Tutois S, Yukawa Y, Mathieu O, Cuvillier C, Espagnol MC, Picard G and Tourmente S. (2001). Analysis of the 5S RNA Pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature RNA. *Genome Res* 12: 132-144.
- Deza Rivasplata, Jaime & Delgado de la Flor Badaraco, F. (2018). La Domesticación de los Andes (U. A. Peruanas (ed.); Primera ed). www.uap.com.pe
- Escobar Bendezu, S A. (2016) Determinación de cariotipo y nivel de ploidia de aguaymanto *Physalis peruvianum* L. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Felix, L. P., & Guerra, M. (2005). Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 254(3-4), 131-148.
- Fischer, G., Miranda, D., Piedrahita, W., & Jorge Romero, E. (2005). Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. In *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva Physalis peruviana L.* http://www.researchgate.net/profile/Gerhard_Fischer/publication/258052317_Avances_

en_cultivo_poscosecha_y_exportacin_de_la_uchuva_(Physalis_peruviana_L.)_en_Colombia/links/0deec526dc02585545000000.pdf#page=97

- Fischer G., Almanza P., Miranda D. (2014). Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal. 36(1), 001-015.
- Fukushima, K., Imamura, K., Nagano, K. and Hoshi, Y. (2011) Contrasting patterns of the 5S and 45S rDNA evolutions in the *Byblis liniflora* complex Byblidaceae. J. Plant. Res. 124, 231– 244.
- Garcia, S., Kovařík, A., Leitch, A. R., & Garnatje, T. (2017). Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *The Plant Journal*, 89(5), 1020–1030. <https://doi.org/10.1111/tpj.13442>
- García S, Garnatje T, Kovařík A. (2012) Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online. *Chromosoma* 121(4): 389-394.
- Gomez-Rodríguez, V., Rodríguez-Garay, B., Palomino G., Martínez, J., Barba-González R. (2013) Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species of *Agave* (Asparagales, Asparagaceae) *Comp Cytogen* 7(3):191-203.
- González Monroy, R. M., & Rojas Martínez, A. E. (2014). La relevancia evolutiva de los ecotipos. *Elementos*, 21(95), 49–54. <http://www.elementos.buap.mx/num95/htm/49.htm>
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genetics research international*, 2015.
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and genome research*, 120(3-4), 339-350.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS one*, 9(2), e87624.
- Herrera, A.M, M., Fischer, G., & María Isabel Chacón, S. (2012). Agronomical evaluation of cape gooseberries (*Physalis peruviana* L.) from central and north-eastern Colombia. *Agronomía Colombiana*, 30(1), 15–24.

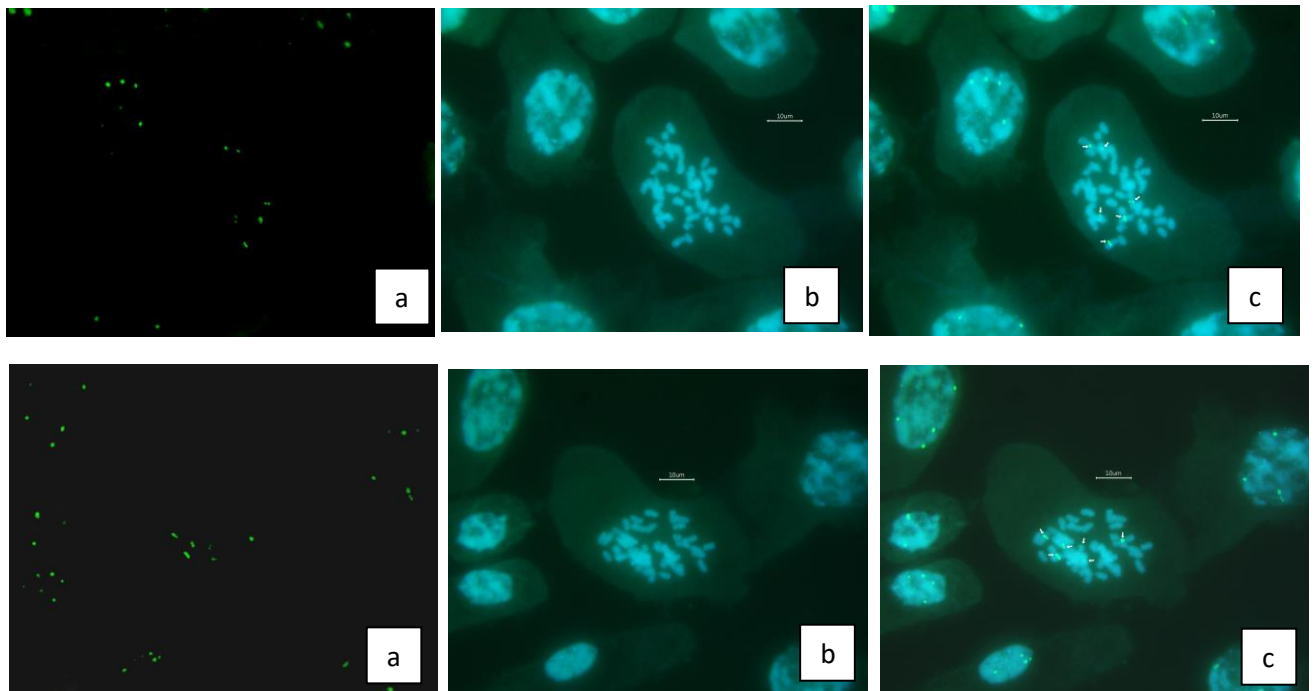
- Herrera, J. C. (n.d.). Aguaymanto, el berry originario del Perú que Colombia explota mucho mejor a nivel mundial. Retrieved January 10, 2020, from <https://agraria.pe/noticias/aguaymanto-el-berry-originario-del-peru-que-colombia-15414>
- Jiang, J. (2019). Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research*, 27(3), 153–165. <https://doi.org/10.1007/s10577-019-09607-z>
- Knapp, S., Spooner D. M., & Blanca León. (2006). Solanaceae endémicas Del Perú. *Revista Peruana De Biología* 13 (2):612s-43. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i2.1918>.
- Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus-rDNA instability maintains genome integrity. *Bioessays*, 30(3), 267-272.
- Medina-Medrano JR, Almaraz-Abarca N, Reyes-Martínez A, Barriada-Bernal LG, Delgado-Alvarado EA, Rivera-Rodríguez DM, C.-V. (2012). El género *Physalis* en durango: Revisión de la distribución y usos. *Agr. Sci.* <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8846>
- Liberato S., Betancourt E., Argüelles J., Núñez V., Barrero L. (2014). Citogenética de genotipos de uchuva, *Physalis peruviana* L., y *Physalis floridana* Rydb., con respuesta diferencial a *Fusarium oxysporum*. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 15(1), 51-61.
- Menzel M.Y. (1951). The Cytotaxonomy and Genetics of *Physalis*. *Proc Am Phylos Soc.*, 95(2), 132-183.
- Muravenko, O.V., Amosova, A.V., Samatadze, T.E., Semenova, O.Y., Nosova, I.V., Popov, K.V., Shostak, N.G., Zoshchuk, S.A. and Zelenin, A.V. (2004) Chromosome localization of 5S and 45S ribosomal DNA in the genomes of *Linum* L. species of the section *Linum* Syn. *Protophyllum* and *Adenolinum*. *Russ. J. Genet.* 40, 193– 196.
- Navarro Oré, L. (2015). Estudio de pre-factibilidad para la instalación de una planta industrial de envasado de Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) fresco, en Ayacucho. Tesis para optar el Grado de Bachiller. Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. <<http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1184>>. Acceso 28/04/2019
- Pedrosa-Harand, A., de Almeida, C. C. S., Mosiolek, M., Blair, M. W., Schweizer, D., & Guerra, M. (2006). Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common

- bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(5), 924-933.
- Poggio, L; Confalonieri, V.; Comas, C. Gonzalez, G. & Naranjo, CA. (2000). Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 1021-1027.
- Ramadan, M. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value and functional properties of Cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*, Amsterdam, 44(7), 1830-1836.
- Repo de Carrasco, Ritva, & Encina Zelada, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(2), 108-124
- Rodríguez, N. & Bueno, M. (2006). Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 11(2), 75 - 85.
- Rosato, M., Kovarik, A., Garilleti, R., & Rosselló, J. A. (2016). Conserved Organization of 45S rDNA Sites and rDNA Gene Copy Number among Major Clades of Early Land Plants. *PloS one*, 11(9), e0162544.
- Sánchez B., P E. (2014). Nivel de ploidía de plantas de uchuva provenientes de cultivo de anteras. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Schreiber Frank. (2012). Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) en condiciones de valles andinos. *Sierra Exportadora, Perú*, 2:23-24
- Setiawan, A. B., Purwantoro, A., & Wibowo, A. (2020). Cytological distinctions between timun suri and cucumber discovered by fluorescence in situ hybridization (Fish) using 45s ribosomal dna gene. *Agrivita*, 42(3), 584–592. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v42i3.2142>
- Trillos O, Cotes J, Medina C, Lobo M, Navas A. (2008). Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). *Rev. Bras. Frutic*, 30(3): 708-715.

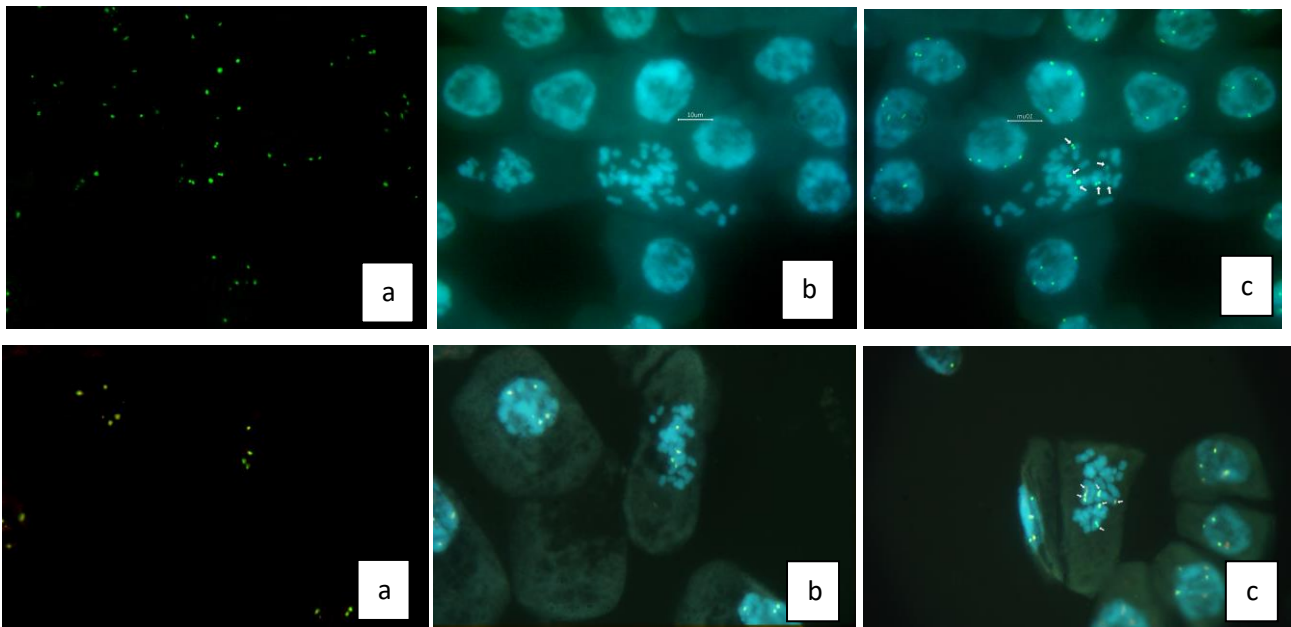
- Vakhitov, V. A., Gimalov F.R., Nikonorov YM. (1986). Determination of the number of copies of genes coding for 5S rRNA and tRNA in the genomes of 43 species of wheat and *Aegilops*. *Genetika, USSR*, 22(4): 676–683.
- Volkov R.A., Zanke C., Panchuk I.I., Hemleben V. (2001). Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet*, 103, 1273-1282.
- Wenzel WG. (1973). A Cytological Study of Colchiploid Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Agroplantae*, 5:79-84.
- Yagi, K., Pawełkiewicz, M., Osipowski, P., Siedlecka, E., Przybecki, Z., Tagashira, N, & Płader, W. (2015). Molecular cytogenetic analysis of *Cucumis* wild species distributed in southern Africa: physical mapping of 5S and 45S rDNA with DAPI. *Cytogenetic and genome research*, 146(1), 80-87.
- Ziang Li, Yunfei Bi, Xing W., Yunzhu W., Shuqiong Y., Zhentao Z., Jinfeng C. Qunfeng L. (2018). Chromosome identification in *Cucumis anguria* revealed by cross-species single-copy gene FISH. *Genome*, 61 (6), 397–404.

ANEXOS

ANEXO 1. Metafases somáticas de *P. peruviana*, población Celendín, hibridadas con la sonda 5s rADN, detectada con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (fluorescencia verde) y contrateñidas con DAPI. a) 5s ADNr, b) DAPI, c) DAPI más 5s ADNr (las flechas indican la posición de las señales, la barra blanca presenta una escala de 10 μm)



ANEXO 2. Metafases somáticas de *P. peruviana*, población San Pablo, hibridadas con la sonda 5s ADNr, detectada con un conjugado de neutravidina – Oregon Green 488 (fluorescencia verde) y contrateñidas con DAPI. a) 5s ADNr, b) DAPI, c) DAPI más 5s ADNr (las flechas indican la posición de las señales, la barra blanca presenta una escala de 10 μ m)



ANEXO 3. Constancia de identificación botánica de las muestras colectadas de Aguaymanto, Celendín, Cajamarca, Perú.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA N° 223-USM-2015

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas) recibida de **Yajahaira Nevenka CARBAJAL GONZÁLES**; alumna de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Physalis peruviana* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Physalis*

ESPECIE: *Physalis peruviana* L.

Nombre vulgar: "aguaymanto"
Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.



Fecha, 26 de octubre de 2015

Haydee Montoya Terreros
Dra. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 4. Constancia de identificación botánica de las muestras colectadas de Aguaymanto, San Pablo, Cajamarca, Perú.



"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA N° 224-USM-2015

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas) recibida de **Cesar Diego ORIHUELA TACURI**; alumno de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Physalis peruviana* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Physalis*

ESPECIE: *Physalis peruviana* L.

Nombre vulgar: "aguaymanto"
Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida.

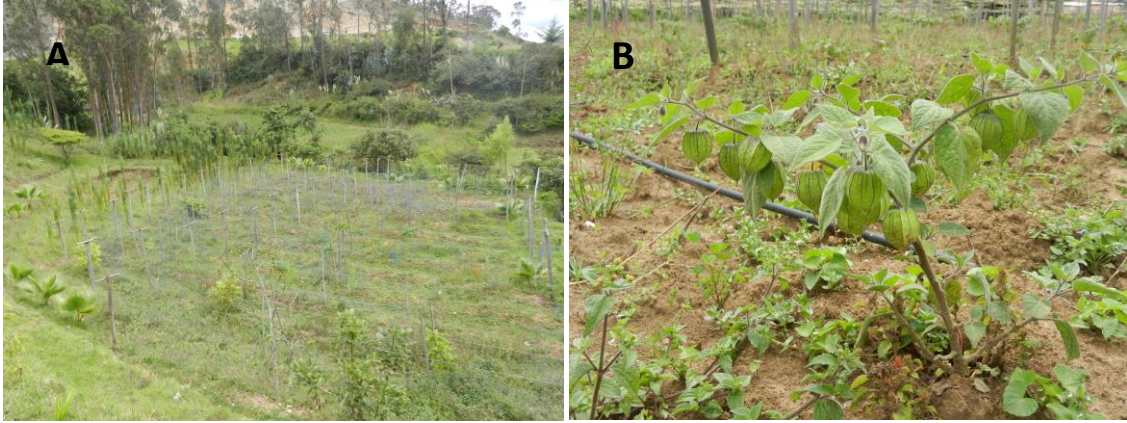
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 26 de octubre de 2015



Dra. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 5: Colecta en Celendín. **A.** área de cultivo **B.** estado de la planta y colecta.



ANEXO 6. Colecta en San Pablo. **A.** flor de la planta **B.** estado de la planta y colecta. **C.** campo de cultivo.



