Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Análisis citogenético molecular de poblaciones de *Physalis peruviana* cultivadas y silvestre de los departamentos de Ayacucho y Cajamarca: Un mapeo físico mediante FISH del ADNr 5s y 45s

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Marlon Yuri GARCIA PAITAN

ASESOR

Alberto LOPEZ SOTOMAYOR

Lima, Perú

2022



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

Garcia, M. (2022). *Análisis citogenético molecular de poblaciones de Physalis peruviana cultivadas y silvestre de los departamentos de Ayacucho y Cajamarca: Un mapeo físico mediante FISH del ADNr 5s y 45s*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Marlon Yuri Garcia Paitan
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74087343
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3028-3454
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Alberto Ernesto López Sotomayor
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10472260
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6070-5836
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	Rosa Antonia Gonzales Gonzales
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06931752
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Hector Javier Sanchez Sotomayor
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06002430
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.1.3. Diversidad Genética
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Recursos Genéticos (RecGen)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. Resolución rectoral N°. RR-4692-19, proyecto con código B19100214. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de Investigación para Grupos de Investigación. Resolución rectoral N°. RR-03202-R-18, proyecto con código B18100191.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2019 – Junio 2021
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Genética, Herencia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07 Ciencias de las plantas, Botánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.10

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 16:10 horas del 23 de febrero de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://zoom.us/j/92832725455?pwd=QWVoMXZFSEdhdE9DSmwzUHcvYTRSZz09, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **MARLON YURI GARCIA PAITAN.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N° UNMSM-20220000037**, el titulando expuso su Tesis: **"ANÁLISIS CITOGENÉTICO MOLECULAR DE POBLACIONES DE *Physalis peruviana* CULTIVADAS Y SILVESTRE DE LOS DEPARTAMENTOS DE AYACUCHO Y CAJAMARCA: UN MAPEO FÍSICO MEDIANTE FISH DEL ADNr 5s y 45s"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **20**, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES.**

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **MARLON YURI GARCIA PAITAN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 18:13 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de febrero de 2022.

Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR
(ASESOR)

Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO
(PRESIDENTE)

Blga. ROSA GONZALES GONZALES
(MIEMBRO)

Blgo. HECTOR SANCHEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

RESUMEN

Physalis peruviana "aguaymanto", es una planta nativa de los andes peruano perteneciente a la familia Solanaceae. Actualmente presenta un creciente interés por parte de los agricultores del Perú debido al aumento en la demanda internacional, lo cual también ha despertado interés por parte del estado. Este fitorecurso posee pocos estudios de diversidad genética en el país, por tal motivo es necesario la caracterización genética entre distintas poblaciones cultivadas y silvestres. Uno de los enfoques utilizados para este fin es el citogenético, siendo las técnicas de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) las que tienen mayor resolución que las técnicas de tinción clásica. Esta técnica citomolecular usa sondas de ADN ribosomal (ADNr) 5s y 45s para caracterizar poblaciones mediante su mapeo en los cromosomas evaluando su número de señales y posición. De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se realizó un análisis citogenético molecular utilizando FISH con ADNr 5s y 45s para investigar poblaciones cultivadas y silvestres de aguaymanto de los departamentos de Ayacucho y Cajamarca. Se observó un predominio de 6 sitios ADNr 5s en todas las poblaciones y para el ADNr 45s, un número de 2 y 4 sitios para las poblaciones cultivadas y silvestre respectivamente, en ambos ADNr se observó una ligera variación intrapoblacional. Del análisis de los cromosomas que presentaban ADNr 5s y 45s, se logró caracterizar 9 tipos de cromosomas en base a su morfología, posición del ADNr y conservación en las poblaciones de aguaymanto. Estas fueron el *N1*, *N2*, y *N3* que se conservaban en todas las poblaciones; los *S1*, *S2* y *S3* en las poblaciones silvestres; *C1* y *C2* en las poblaciones cultivadas; y *CC* solo en la población cultivada en Cajamarca. Adicionalmente se encontró una pequeña variabilidad interpoblacional de un mismo tipo de cromosoma con respecto a sus datos morfométricos y de intensidad de fluorescencia. La caracterización citomolecular mostró una marcada diferencia entre las poblaciones silvestres y cultivadas, con variaciones intrapoblacionales en cada una de ellas.

Palabras clave: FISH, aguaymanto, ADNr 5s, ADNr 45s, citogenética molecular

ABSTRACT

Physalis peruviana "aguaymanto", is a native plant of the Peruvian Andes belonging to the Solanaceae family. Currently, it presents a growing interest on the part of Peruvian farmers due to the increase in international demand, which has also aroused interest on the part of the state. This plant resource has few studies of genetic diversity in the country, for this reason genetic characterization between different cultivated and wild populations is necessary. One of the approaches used for this purpose is cytogenetics, with Fluorescent In situ Hybridization (FISH) techniques being the ones that have higher resolution than classical staining techniques. This cytomolecular technique uses 5s and 45s ribosomal DNA (rDNA) probes to characterize populations by mapping the chromosomes evaluating their signal number and position. According to the above, in this work a molecular cytogenetic analysis was performed using FISH with 5s and 45s rDNA to investigate cultivated and wild populations of aguaymanto from the departments of Ayacucho and Cajamarca. A predominance of 6 hybridization sites of 5s rDNA sites was observed in all populations and for the 45s rDNA, a number of 2 and 4 hybridization sites for the cultivated and wild populations respectively, in both rDNA a slight intrapopulation variation was observed. From the analysis of the chromosomes that presented hybridization of 5s and 45s rDNA, it was possible to characterize 9 types of chromosomes based on their morphology, rDNA position and conservation in the aguaymanto populations. These were the *N1*, *N2*, and *N3* that were conserved in all populations; *S1*, *S2* and *S3* in wild populations; *C1* and *C2* in cultivated populations; and *CC* only in the population of Cultivated Cajamarca. Additionally, a small interpopulation variability of the same type of chromosome was found with respect to its morphometric data and fluorescence intensity. Cytomolecular characterization showed a marked difference between wild and cultivated populations, with intrapopulation variations in each of them.

Key Words: FISH, aguaymanto, 5s rDNA, 45s rDNA, molecular cytogenetics

DEDICATORIA

A mis padres, Norma y Yuri los cuales siempre me han tenido mucha confianza y apoyo en mis proyectos académicos. Además de brindarme siempre su cariño y amor en cada etapa de mi vida e inculcarme buenos valores. A ellos, les dedico este pequeño fruto de mi dedicación y esfuerzo, siempre estaré eternamente agradecido con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, al grupo de investigación en Recursos Genéticos, a mis profesores de la facultad, por su contribución en mi formación académica.

Al Blgo. Alberto López, por haberme dado la confianza de empezar mi experiencia cienitífica en el laboratorio y por orientarme a lo largo de estos años sobre como es el desarrollo de los proyectos de investigación, lo cual me ayudó mucho a crecer académicamente.

A la Mg. Maria Siles, por enseñarme los primeros pasos en la investigación citogenética, brindarme su confianza en el desarrollo del trabajo de laboratorio y compartir la emoción de ver los resultados del FISH, luego de realizar las maratónicas sesiones de láminas en blanco.

A mis primeros compañeros de laboratorio Santiago, Alex, Edith, Paul e Ingrid, los cuales aprendimos juntos a iniciarnos en la investigación y en el establecimiento de los protocolos del laboratorio. Asi como también a Yahaira y Henrry los cuales fueron nuestros primeros instructores en el laboratorio, que ayudaron a iniciarnos en el trabajo experimental.

También a mis compañeros de laboratorio que presenciaron el desarrollo de mi tesis y apoyaron en varios aspectos a que pueda culminar este proyecto, un agradecimiento especial a Gustavo, Maricielo, Ismael y Ana.

A mis compañeros de estudio durante la universidad y un especial agradecimiento a Salyoc Tapia, Santiago Alvarez, Stefanny Villarreal, Daniel Torrejon, Alex Proleon, Rydberg Supo, Nicol Sheen, Soledad Vega, Jorge Mantilla por los gratos momentos durante la época del pregrado.

A Susan Echavarria, por ser mi compañera, por su compañía, cariño y apoyo incondicional durante mi desarrollo profesional y personal. También por los buenos momentos que compartimos durante nuestra formación académica.

A mi hermana Sharon, por su alegría y apoyo en toda mi formación academica. Y deseándole mi apoyo y consejos en su nueva etapa universitaria.

A mi familia, por siempre apoyarme y creer en mí durante toda mi formación profesional, además de siempre darme ánimos y consejos. Un agradecimiento especial a mis abuelos German y Maria, por brindarme su cariño y hospitalidad durante todos estos años.

Al financiamiento brindado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos -mediante RR Nº º 03202-R-18 con código de proyecto B18100191 y la RR Nº RR-4692-19 con código de proyecto B19100214

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
2. MARCO TEÓRICO 3
2.1 Generalidades de la especie 3
2.1.1 Origen, Distribución y Nomenclatura 3
2.1.2 Posición taxonómica 3
2.1.2 Aspectos Botánicos 4
2.2 Importancia del comercio de aguaymanto en el Perú 5
2.3. Importancia del estudio de los recursos genéticos para el mejoramiento de cultivares 7
2.4. Herramientas para el estudio de recursos genéticos y programas de mejoramiento 11
2.5. Antecedentes Citogenéticos del Aguaymanto 13
2.6. Marcadores ADN ribosomales 15
2.6.1 Ribosomas 15
2.6.2 Características del ADN ribosómico (ADNr) 16
2.6.3 Aplicación del uso del ADNr en el estudio citogenético molecular en plantas 19
3. OBJETIVOS 25
3.1 Objetivo general 25
3.2 Objetivos específicos 25
4. HIPÓTESIS Y VARIABLES 26
4.1 Hipótesis nula 26
4.2 Hipótesis alternativa 26
4.3 Variables Independientes 26
4.4 Variables Dependientes 26
5. MATERIALES Y MÉTODOS 28
5.1. Lugares de colecta 28
5.2. Material Biológico Colectado 28
5.3. Material de Laboratorio 28
5.3.1. Equipos 28
5.3.2. Materiales de Vidrio 29
5.3.3 Kits Comerciales y Enzimas 29
5.3.4. Moléculas para detección de la Sonda 30
5.3.5. Reactivos 30
5.4. Obtención de las placas metafásicas o las láminas en blanco 31

5.4.1. Extracción de las semillas de Aguaymanto....31
5.4.2. Germinación de semillas y fijación de raíces....31
5.4.3. Preparación de cromosomas vegetales a partir de ápices radicales....31
5.5. Obtención de las sondas ADNr 5s y 45s....32
5.5.1 Extracción de ADN genómico....32
5.5.2. Amplificación del ADNr....32
5.5.3. Marcado de los amplicones de ADNr....33
5.6. Hibridación Fluorescente in Situ (FISH)....34
5.7. Análisis Estadístico....36
6. RESULTADOS....38
6.1. Obtención de láminas en blanco....38
6.2 Obtención de las sondas ADNr....38
6.2.1 Sonda para el locus ADNr 5s....38
6.2.2 Sonda para el locus ADNr 45s....42
6.3 Hibridación Fluorescente in situ....45
6.3.1 Obtención y Procesamiento de Imágenes....45
6.3.2 Número de sitios de ADNr....47
6.3.3 Caracterización de los cromosomas que presentan ADNr....51
6.3.4 Comparación de los tipos de cromosomas con señales ADNr....57
7. DISCUSIÓN....64
7.1. Láminas en blanco y marcado de las sondas ADNr....64
7.2 Número de sitios ADNr 5s y 45s....65
7.3. Distribución de los sitios ADNr 45s y 5s en los cromosomas....70
7.4. Morfología de los cromosomas e intensidad de fluorescencia....72
8. CONCLUSIONES....75
9. RECOMENDACIONES....76
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS....77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura genética de las unidades ADNr 45s. **17**

Figura 2. Estructura genética de las unidades ADNr 5s. **18**

Figura 3. Lámina en Blanco. **38**

Figura 4. Electroforesis en agarosa al 2% de la estandarización de la T° de Alineamiento y el tiempo de extensión de la PCR del ADNr 5s.. ..... **40**

Figura 5. Electroforesis en agarosa al 2% del antes y después del proceso de marcado con Nick Translation. **42**

Figura 6. Electroforesis en agarosa al 2% de la estandarización de la T° de Alineamiento del gen 18s. **43**

Figura 7. Electroforesis en agarosa al 2% de la estandarización del tiempo de reacción del Nick Translation para el marcado del amplicón 18s. **45**

Figura 8. Fotografias de las señales de las sondas de ADNr y DAPI y su posterior superposición evidenciando hibridación en los cromosomas... ..... **46**

Figura 9. Porcentaje del número de sitios de ADNr de cada población. **47**

Figura 10. Imágenes del FISH de las poblaciones cultivadas con las señales fluorescentes del ADN ribosomal 5s (verde) y 45s (rojo). **49**

Figura 11. Imágenes del FISH de las poblaciones silvestres con las señales fluorescentes del ADN ribosomal 5s (verde) y 45s (rojo). **50**

Figura 12. Cromosomas que presentaban señales de hibridación de ADNr de los 12 mejores campos metafásicos de las poblaciones cultivadas apareados con sus pares homólogos. **52**

Figura 13. Cromosomas que presentaban señales de hibridación de ADNr de los 12 mejores campos metafásicos de las poblaciones silvestres apareados con sus pares homólogos. **53**

Figura 14. Tipos de cromosomas que presentaban hibridación de la sonda de ADNr. **55**

Figura 15. Tipos de cromosomas que presentaban hibridación de la sonda de ADNr por cada población. **57**

Figura 16. Gráfico de cajas de los datos morfométrico y de fluorescencia de los tipos de cromosomas analizados estadísticamente. **62**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos geográficos de los lugares de colecta **28**

Tabla 2. Condiciones del ciclo de PCR para la amplificación del ADNr 5s. **41**

Tabla 3. Condiciones del ciclo de PCR para la amplificación del gen 18s **44**

Tabla 4. Porcentaje del número de sitios de ADNr por cada población **48**

Tabla 5. Datos morfométricos de los 9 tipos de cromosomas que presentaban hibridación y su cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las señales ADNr. **59**

Tabla 6. Resultados de las pruebas estadísticas de normalidad y de comparación de grupos de los datos morfométricos y de fluorescencia entre los cromosomas que presentaban hibridación entre las poblaciones. **61**

Tabla 7. Valores promedio de los datos morfológicos y florescencia de los tipos de cromosomas que no presentaban datos suficientes para las pruebas estadísticas **63**

1. INTRODUCCIÓN

Physalis peruviana "aguaymanto" es una solanácea que ha generado interés comercial en los últimos años, esto debido a la creciente demanda de alimentos orgánicos a nivel internacional. Debido a esto, la producción de aguaymanto se ha incrementado y varios agricultores lo han considerado como un potencial cultivo alternativo para su comercialización. El Perú es considerado el segundo productor de aguaymanto a nivel de Latinoamérica, después de Colombia. Esto se ha visto reflejado en un aumento en la producción y comercialización de aguaymanto en varios departamentos del Perú, incluso este crecimiento no ha sido frenado en la pandemia. Sin embargo, la cantidad de aguaymanto producido en comparación con Colombia y otros países fuera del continente americano, sigue siendo muy limitado (Sierra y Selva Exportadora, 2021).

El Perú presenta un amplio repertorio de recursos genéticos que aún falta explorar y generar conocimiento que permita explotarlos con enfoques de programas de mejoramiento; en este marco se encuentra el aguaymanto. Para cumplir con este objetivo, es necesario explorar tanto en las poblaciones silvestres, como en las cultivadas; de manera que puedan ser caracterizados en base a sus caracteres morfológicos, agronómicos y genéticos en todas las poblaciones posibles. Uno de los enfoques que permite la caracterización y evaluación de la diversidad genética de las plantas es el análisis citogenético. Esto se logra mediante el análisis de variables cromosómicas, como es el número de cromosomas que contiene las células y la morfología que presenta cada uno de estos, evaluando las longitudes de los brazos cromosómicos y las presencias de constricciones primarias o secundarias. La descripción de estas variables permite la caracterización citogenética de la especie o población en estudio. Sin embargo en los últimos años las técnicas de citogenética clásica han tenido muchas limitaciones a la hora de caracterizar morfológicamente los cromosomas de especies que presentan un tamaño relativamente pequeño y un número elevado, estas son las características que presenta el aguaymanto. Este análisis clásico

aumenta en dificultad cuando se analiza individuos que presentan un grado de ploidía elevado (Arroyo, 2016; Nohra et al., 2006).

Gracias al avance de la biología molecular se ha podido desarrollar la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* o FISH por sus siglas en inglés, el cual supera las limitaciones de la citogenética clásica y permite una caracterización más informativa para el análisis de la diversidad y la citotaxonomía. Esta técnica se basa en la hibridación de sondas específicas a una región de ADN complementaria, emitiendo una señal fluorescente para permitir visualizar su ubicación en los cromosomas. Las sondas más utilizadas para la evaluación citomolecular son las de ADN ribosomal (ADNr). Estos ADNr se clasifican en dos familias: la familia principal ADNr 45s, que codifica los genes de ARN ribosómico 18S, 5.8S y 26S y la familia menor ADNr 5s, que codifica genes ribosomales 5s. Estos ADNr se caracterizan por ser conservados entre las especies de plantas y presentarse en repeticiones en tándem a lo largo del genoma. Esta característica los hace inestables, haciéndolos variar en cuanto al número de sitios dentro del complemento cromosómico, así como también en la ubicación dentro del cromosoma. Esta variabilidad permite considerarlos como marcadores ideales para evaluar y caracterizar citomolecularmente a las poblaciones de plantas (Herrera, 2007).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se realizó una caracterización citogenético molecular de las poblaciones cultivadas y silvestres de aguaymanto, contribuyendo de esta manera a la caracterización de este recurso genético en el país y superando las limitaciones que se tenía al analizarlo con técnicas de citogenética clásica. Además debido al análisis aquí presentado, este sería el primer estudio que utiliza dos marcadores ADNr 5s y 45s para comparar poblaciones cultivadas y silvestres, siendo también el primer reporte citogenético molecular del género *Physalis* en cuanto al mapeo del marcador 45s. Esto permitirá aportar información a la citotaxonomía de la familia Solanaceae y sentar las bases para estudios de mayor envergadura que caractericen este recurso genético mediante la técnica de FISH, dejando precedente de su uso como

una potencial herramienta para los programas de mejoramiento genético en el país. Así mismo, la generación de este conocimiento contribuirá a mejorar la competitividad frente a los otros países productores a nivel internacional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de la especie

2.1.1 Origen, Distribución y Nomenclatura

Physalis peruviana es una planta herbácea perteneciente a la familia Solanaceae, originaria y diversificada en la Cordillera de los Andes, principalmente en los países de Perú, Colombia y Ecuador. Actualmente se distribuye en casi todos los altiplanos de los trópicos y en varias partes de los subtrópicos, incluyendo Malasia, China, África y el Caribe. Esta especie tiene varias denominaciones de acuerdo a la región geográfica comercializada, por ejemplo en Latinoamérica es muy conocido como: “aguaymanto”, “uvilla”, “uchuva” y “capulí”; en países de habla hispana de Europa se lo conoce como “alquequenje” y en Sudáfrica como “cape gooseberry”. Sin embargo el nombre comercial internacional es “Golden berries” (Cruzat y Honorato, 2010; Singh et al., 2019).

2.1.2 Posición taxonómica

De acuerdo a la recopilación de la base de datos del “Catalogue of Life” (www.catalogueoflife.org), se muestra la taxonomía del aguaymanto. Esta información según el sistema de gestión de datos ARCTOS, presenta una última actualización desde el 2021.

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Género	Physalis
Especie	*Physalis peruviana*

2.1.2 Aspectos Botánicos

Physalis peruviana es una planta perenne que crece en los trópicos a una altura de 1500 a 3000 msnm. Desarrolla óptimamente en temperaturas entre 8°C y 20°C, pero se ve severamente afectada por las heladas y no sobrevive a una temperatura de aproximadamente -2°C (Muniz et al., 2014). Llega a crecer hasta una altura de 1 a 1.5 metros, presentan hojas en forma de corazón, alternas, de 5 a 15 cm de largo y de 4 a 10 cm de ancho. El sistema reticular es ramificado, fibroso y profundo con la raíz principal entre 50 y 80 cm. El tallo principal de la planta es verde, herbáceo y contiene de 8 a 12 nudos, de donde se originan ramificaciones productivas por dicotomía. Cada nodo del tallo da origen a dos yemas, de las cuales una es vegetativa y la otra está floreciendo. La planta tiene flores hermafroditas y pedunculadas que se originan en la yema axilar con cinco pétalos amarillos. El cáliz es verde, formado por cinco sépalos (5 cm de largo) y cubre completamente el fruto durante su fase de desarrollo. El cáliz se vuelve marrón con la maduración de la fruta e indica el momento de la cosecha. El fruto tiene forma de baya, como un pequeño globo, de verde a amarillento, con un diámetro alrededor de 12.5 a 25 mm y un peso de 4 a 10 g (Singh et al., 2019). Las semillas son numerosas, llegando a presentar de 100 a 300 semillas por fruto, además estas suelen germinar fácilmente en suelos con humedad relativa, lo que justifica su crecimiento fuera de las zonas de cultivo. Esto último se evidencia en su alto porcentaje de germinación, el cual se encuentra entre el 85% al 90% de semillas germinadas en 10 a 15 días (Fischer et al., 2005).

Dependiendo de la región y el clima, el cultivo del fruto de *Physalis peruviana* se puede realizar en varios periodos del año, extendiéndose hasta dos años, luego de este tiempo la productividad y la calidad de los frutos disminuyen (Muniz et al., 2014). Adicionalmente, se ha estimado que durante un periodo de cosecha de 4 meses en condiciones óptimas, *Physalis peruviana* puede producir alrededor de 1000 y 2000 frutos

por planta entre variedades cultivadas y silvestres, presentando en general un rendimiento de hasta 6.17kg por planta (Herrera et al., 2011).

Con respecto a las propiedades nutricionales del fruto, este es rico en nutrientes y otros compuestos bioactivos; especialmente contiene grandes cantidades de vitamina C, beneficioso para el sistema inmunológico y como antioxidante. También se ha evidenciado que presenta una gran cantidad de potasio, además contiene compuestos fenólicos que exhiben actividad antioxidante, responsable de eliminar los radicales libres dañinos (Ramadan, 2011). Adicionalmente se ha reportado que también contienen witanólidos, un grupo de lactonas esteroides, de las cuales algunas exhiben actividad anticancerígena y antitumoral (Shenstone et al., 2020).

2.2 Importancia del comercio de aguaymanto en el Perú

A pesar de que el Perú es el centro de diversificación del Aguaymanto (Fischer et al., 2014), el país no se encuentra dentro de los principales productores a nivel internacional. La producción de aguaymanto para el mercado internacional es liderada por Colombia, donde cerca del 90% de la producción mundial es producido por este país y esto en gran parte gracias a que presenta una mejor calidad y cantidad en la producción del fruto comparativamente con otros países. Después le sigue Sudáfrica en producción internacional y de ahí en menor proporción los países de Inglaterra, Nueva Zelanda, India, Zimbabwe, Australia, Ecuador y Perú (Sierra y Selva Exportadora, 2021). Sin embargo a pesar que nuestro país no representa una producción significativa a nivel mundial, este se considera el segundo productor más importante a nivel de Latinoamérica, esto gracias al aumento de la tendencia mundial de preferir alimentos novedosos de origen natural y orgánico aumentando así la demanda de aguaymanto y permitiendo que los productores nacionales aprovechen la situación y mejoren su producción (León, 2021).

En nuestro país las regiones donde se cultiva el aguaymanto se encuentran mayoritariamente en la zona agroecológica denominada Quechua, de clima templado a

templado-frio, siendo los productores tradicionales los departamentos de Cajamarca, Ayacucho, Ancash y Cuzco; y en años recientes se han sumado a la producción las regiones de Huánuco, Junín, Pasco, Lambayeque, Moquegua, Amazonas, Apurímac, Arequipa y Lima; siendo Huánuco el que ha liderado la producción en estos últimos años (Sierra y Selva Exportadora, 2021; Avila, 2013).

El panorama general de producción a nivel nacional muestra un incremento promedio anual del 17% en toneladas de aguaymanto producido, 15% de crecimiento en hectáreas sembradas y un 2 % en cuanto al rendimiento del cultivo (Sierra y Selva Exportadora, 2021). Este incremento está explicado por el aumento de agricultores que han optado tomar al aguaymanto como un cultivo alternativo compatible con su ecosistema local, y esto sumando a las políticas de promoción de cultivo y el incremento de su comercialización, vieron una oportunidad de comercio.

Lo anteriormente mencionado, se evidencia en el informe presentado por el gobierno peruano sobre el análisis de mercado del aguaymanto durante el período 2015 al 2020 (León, 2021). Se menciona que el comportamiento de las exportaciones de aguaymanto en el Perú han sido positivas, creciendo en un promedio anual del 6% en volumen y 4.8 % en valor, pasando de exportar alrededor de US$ 2 millones en el 2015 a casi US$ 2.7 millones el año 2020, siendo el 2018 el mejor año donde se obtuvo más de US$ 4.6 millones. Cifra aún pequeña en comparación con Colombia, con embarques de más de US$ 30 millones.

Este aumento de demanda se espera que se incremente aun más en los próximos años (Mordor Intelligence, 2021; OTA, 2021; Cotera, 2021). Debido a la creciente tendencia del consumo de alimentos orgánicos, los cuales son conocidos por presentar un gran valor nutricional y ser de carácter saludable, se espera que favorezca el crecimiento del mercado de este tipo de alimentos en los próximos cinco años de manera significativa en los países europeos y norteamericanos, incluso el impacto por el COVID-19 no frenará este crecimiento, sino que al contrario debido al aumento del comercio minorista

de alimentos producto del cierre de grandes supermercados, se ha contribuido a generar una mayor conciencia sobre los beneficios para la salud atribuidos a los alimentos orgánicos como consecuencia de la crisis de salud pública y esto ha generado una mayor preferencia para la mayoría de los consumidores frente a otra variedad de alimentos.

Ante el crecimiento comercial del aguaymanto, en el Perú se ha estado proponiendo políticas de apoyo a los agricultores para promover la exportación de sus productos, siendo una de estas el Plan Regional Exportador (PERX) que viene siendo propuesto por el Ministerio de Comercio Exterior y Turismo en la última década. Esto apoyará el cultivo de aguaymanto mediante la asesoría en el proceso de producción, capacitación en buenas prácticas agrícolas, aplicación de nuevas tecnologías, facilitación en el proceso de comercialización y registro de variedades y ecotipos. Esto último es de suma importancia, debido a que se necesita investigaciones y experimentos en los cultivos para poder caracterizarlos a nivel fenotípico y genotípico, y así poder diferenciarlos, ya que se estima que el Perú pueda tener alrededor de 200 ecotipos de aguaymanto (Schreiber, 2012). Estas investigaciones permitirán fortalecer la base de datos en recursos genéticos de la especie para así formular futuros programas de mejoramiento y de esta manera contribuir a mejorar la producción del aguaymanto en el país, todo esto conlleva a tener una mejor ventaja competitiva en el mercado internacional.

2.3. Importancia del estudio de los recursos genéticos para el mejoramiento de cultivares

La mayor parte de los cultivares que sirven de alimentos a nivel mundial se han originado por un proceso de domesticación de las variedades silvestres ancestrales, este proceso que duró muchos siglos, generó un cuello de botella genético que provocó una pérdida de la diversidad genética de muchas especies de cultivares, generando una disminución del repertorio de genes que les permita responder y adaptarse a los cambios adversos de su ambiente. Esto último ha generado pérdidas en el rendimiento de producción en

varios momentos de la historia moderna y limitaciones en el aumento del rendimiento de los cultivos para satisfacer la demanda del crecimiento poblacional. Ante esto los agricultores tienen que recurrir a nuevas fuentes de material genético para solucionar las consecuencias de esta pérdida de diversidad genética, en este sentido cobra importancia los parientes silvestres de los cultivos, los cuales presentan una alta diversidad genética debido a que no sufrieron una restricción en el cruzamiento por el proceso de domesticación y además han estado sometidos a una amplia gama de factores climáticos, suelos, enfermedades, sequías, y otros; lo cual les permitió acumular un amplio repertorio de material genético que les ayudo hacer frente a dichas adversidades. Debido a estas características de los parientes silvestres de los cultivos, se les considera como una fuente de recursos genéticos con el potencial de aportar características beneficiosas a los cultivos, como resistencia a plagas o enfermedades, mejora del rendimiento o estabilidad frente a factores abióticos adversos. Todo esto mediante la transferencia de genes por cruzamiento, cuando hay una relación genética con la especie domesticada, o por técnicas biotecnológicas modernas, ampliando mucho más las posibilidades de mejora genética para los cultivos con especies no relacionadas genéticamente (Hickey et al., 2019).

Un claro ejemplo del uso de parientes silvestres para la creación de nuevas variedades mejoradas fue el que ocurrió en la década de los 80s con los cultivos de maíz (*Zea mays*). Cuando una nueva raza del hongo *Helminthosporium maydis*, que producía la enfermedad del tizón del maíz, empezó a atacar a los cultivos norteamericanos provocando una reducción en el rendimiento de hasta en un 50% y produciendo pérdidas de 1000 millones de dólares; se planteó solucionar el problema mediante el uso de los recursos genéticos de los parientes silvestres del maíz que si presentaban resistencia frente a esta enfermedad. En México se han encontrado variedades silvestre de maíz que eran resistentes a la enfermedad, estas fueron usadas en programas de mejoramiento mediante hibridación para transferir los genes de resistencia a las

variedades cultivadas que estaban siendo afectadas, logrando de esta manera generar una nueva variedad de maíz resistente al tizón y recuperar el rendimiento de este cultivo (Benlioglu y Adak, 2019; Maxted y Kell, 2009). Caso similar también ocurrió con los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) a inicios del siglo XX, donde se usó la especie silvestre de papa *Solanum demissum* para traspasar los genes de resistencia a la enfermedad del tizón hacia variedades cultivadas de papa, desde entonces se estima que más del 50% de las variedades comerciales de papa en el mundo contienen el germoplasma *Solanum demissum* incorporado dentro de su material genético (Pérez et al., 2001).

En otros casos se observó que el uso de parientes silvestres es estrictamente necesario para la subsistencia del cultivo frente a la creciente demanda de alimentos, como es el caso del tomate (*Lycopersicum esculentum*) que sufrió un enorme cuello de botella genético durante su proceso de domesticación provocando que contenga menos del 5% de la variación genética de sus parientes, traduciéndose en un escaso polimorfismo y poco arsenal genético para hacerle frente a condiciones de estrés abióticos o bióticos (Fentik, 2017). Ante esto se han usado varias especies silvestres relacionadas como: *L. cheesmanii, L. pennellii* y *L. peruvianum,* las cuales fueron utilizadas para transferir tolerancia a la sequía, la salinidad y resistencia a insectos; *L. pimpinellifolium* para mejorar la forma y tamaño del fruto; *L. pimpinellifolium* para transferir resistencia a enfermedades, madurez temprana, hábito de crecimiento determinado y la partenocarpia (Maxted y Kell, 2009).

Con respecto a *Physalis peruviana*, los estudios de los parientes silvestres del cultivo para la caracterización de los recursos genéticos aún son incipientes. Además de acuerdo al incremento de la demanda que ha tenido este fruto en los últimos años, se ha visto la necesidad de aumentar su rendimiento, esto se ve limitado porque los frutos cosechados (20% a 45%) se descartan debido a problemas de agrietamiento y que el 15% de la producción de fruta no cumple con los estándares de calidad requeridos,

además en los últimos años los cultivos de aguaymanto se han visto afectados por una enfermedad producida por *Fusarium oxysporum* que causa marchitez vascular; todo lo anteriormente mencionado reduce la cantidad de fruta válida para el comercio y genera la necesidad de realizar programas de mejoramiento (Garcia et al., 2018). Se han reportado variedades de aguaymanto en función a los ecotipos y a variables como el tamaño, color y forma del fruto, de la flor, altura y tamaño de la planta. Los tres ecotipos cultivados con mayor frecuencia a nivel mundial proceden de Kenia, Sudáfrica y Colombia; para el Perú se han reportado seis ecotipos: Urquiaco (Cajamarca), Agocucho (Cajamarca), Huancayo 1 y Huancayo 2 (Junín), Cajabamba (Cajamarca) y Eru (Cajabamba) (Sierra y Selva Exportadora, 2021). Cada uno de estos ecotipos mencionados anteriormente, representan un potencial repertorio genético que debe ser estudiado para programas de mejoramiento y así mejorar el rendimiento de producción, esto también incluiría a los ecotipos provenientes de poblaciones silvestres que aún no han sido correctamente caracterizados. Por ejemplo se ha evidenciado que la composición de carbohidratos puede variar de acuerdo a diferentes altitudes en el cual se desarrollan las poblaciones (Singh et al. 2019). También se ha reportado que en distintas accesiones silvestres, existe una relación entre la acidez total titulable y la madurez del fruto, lo cual presenta un gran potencial genético que permitiría aumentar el período de maduración y por lo tanto, el período de almacenamiento de los frutos (Herrera et al., 2011). Adicionalmente, en un estudio donde se analizaron 100 accesiones de aguaymanto entre silvestres y cultivados, se encontraron potenciales accesiones que sirvan para poder superar el problema de agrietamiento y falta de firmeza del fruto (Garcia et al., 2018). Con respecto a la creación de híbridos resistentes a *Fusarium oxysporum*, hay estudios incipientes del uso de *Physalis floridana* para el traspaso del genotipo resistente a accesiones de aguaymanto procedente de Colombia (Berdugo et al., 2015).

2.4. Herramientas para el estudio de recursos genéticos y programas de mejoramiento

Muchos de los actuales estudios enfocados al descubrimiento y uso de los recursos genéticos se han apoyado en nuevas herramientas de la biología molecular, con el fin de realizar la correcta caracterización genética tanto del cultivar como de la especie con el potencial genético a explotar, además de poder realizar un correcto seguimiento de la heredabilidad del genotipo de interés en los esquemas de cruces y selección durante el mejoramiento. En ese sentido son de gran ayuda el uso de los marcadores moleculares, los cuales son una región del ADN que muestra polimorfismo, como las deleciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos entre diferentes individuos. Los sistemas de marcadores moleculares de ADN más utilizados en plantas son: RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica), RAPD (Fragmentos polimórficos amplificados al azar), AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado), SSR (Repetición corta en tándem o microsatelites) y SNP (Polimorfismos de nucleótido único) (Jiang, 2013). La utilidad de estos marcadores moleculares se debe a su potencial vínculo con el genotipo que expresa el rasgo de interés del cual se quiere realizar la transferencia de genes durante el mejoramiento. De este modo permite una correcta caracterización genotípica de los progenitores y facilita mucho el seguimiento de las posteriores generaciones durante el mejoramiento por cruzamiento. Esto último se traduce en una agilización del procedimiento de mejoramiento, ya que al rastrear el marcador molecular en la progenie permite ubicar fácilmente a los que han heredado de manera correcta el genotipo de interés, incluso en etapas de plántula, de modo que no es necesario esperar a que la planta se desarrolle completamente para ver ciertos rasgos de carácter adulto. De manera similar, se da cuando se quiere evaluar la heredabilidad de rasgos que necesitan condiciones especiales para ser analizadas como enfermedades o condiciones abióticas extremas. Todo lo anterior apunta a que el mejoramiento asistido por marcadores moleculares mejora la rapidez, precio y precisión

en el desarrollo de los programas de mejoramiento, a diferencia de usar solo los ensayos fenotípicos convencionales (Jiang, 2015).

Por otro lado, la citogenética también juega un papel fundamental durante los programas de mejoramiento. Debido a que el éxito en los cruzamientos va a depender del conocimiento de las relaciones citotaxonómicas, la estructura citogenética y la relación del desarrollo evolutivo entre especies (Benlioglu y Adak, 2019). Para lograr esto se necesita de la caracterización citogenética de los parentales y el estudio de la asociación cromosómica durante la meiosis de los híbridos, esto permitirá evaluar su compatibilidad y por ende su potencialidad en la producción de descendencia. Durante la generación de híbridos con la capacidad de reproducirse, es muy necesario determinar las constituciones cromosómicas de las generaciones posteriores, así como también caracterizar los cromosomas recombinantes que se transmiten a sus progenies (Benavente et al., 2008) Esto último con el fin de monitorear la transmisión y estabilización de cromosomas específicos o recombinantes en el linaje híbrido que contengan el genotipo de interés.

Las técnicas citogenéticas empezaron con las tinciones convencionales al material genético, el cual aún sigue siendo muy usada para el recuento de cromosomas de una especie, siendo básica esta información para estudios de biodiversidad. Ante las limitaciones de la caracterización morfológica de los cromosomas en la tinción convencional surgieron las denominadas técnicas de bandeo, como el bandeo C; siendo este una técnica muy limitada en plantas, porque la mayoría de publicaciones con esta técnica era en trigo y otros cereales (Benavente et al., 2008). Posteriormente surgieron las técnicas citomoleculares, gracias a los avances de la biología molecular y a los estudios genómicos. Una de estas técnicas es el FISH (Hibridación fluorescente *in situ*); el cual tiene la capacidad de poder caracterizar cromosomas específicos y genomas individuales en muchas especies de plantas, logrando tener de esta manera el potencial de discriminar entre parentales e híbridos interespecíficos, siendo una poderosa

herramienta al momento de evaluar si los cromosomas específicos están o no involucrados en configuraciones de apareamiento (Cifuentes et al., 2006). Otra técnica citomolecular muy difundida es la denominada GISH (Hibridación genómica *in situ*), el cual permite evaluar el grado de conservación de genomas a nivel cromosómico y presenta una mayor resolución a la hora de analizar los segmentos cromosómicos que han sufrido un intercambio eventual de cromátidas durante la meiosis, permitiendo de esta manera el análisis del emparejamiento de cromosomas entre los híbridos interespecíficos durante la meiosis para el monitoreo de la introgresión de genes de interés (Benavente et al., 2008). Actualmente la técnica citomolecular más reciente es el oligo-FISH, el cual mediante análisis bioinformático del genoma de la especie de interés, se crean sondas para la identificación específica de cada cromosoma individual; esto mejora de manera exponencial la creación y resolución del cariotipo para la caracterización de especies de plantas, de esta manera establecer sus relaciones evolutivas (Braz et al., 2018). Todos estos datos resultan muy útiles durante las etapas de formulación de los programas de mejoramiento.

2.5. Antecedentes Citogenéticos del Aguaymanto

Uno de los primeros reportes citogenéticos del género *Physalis* fue realizado por Menzel (1951), donde observó especies con un número cromosómico de 24 y 48, reportando un número básico para el género de x=12. Cuando el fruto del aguaymanto comenzó a cobrar importancia comercial, se empezó a realizar algunos estudios destacados sobre la especie, especialmente en Colombia tales como el de Rodriguez y Bueno (2006), quienes reportan una dotación cromosómica de 2n=24 para ecotipos silvestres, 2n=32 para el ecotipo Colombia y 2n= 48 para el ecotipo Kenia; este estudio también resaltó la importancia del nivel de ploidía en los caracteres morfológicos. Otro estudio también del mismo país, reportó un número de 48 cromosomas para los ecotipos de Colombia y Kenia, mientras que para el ecotipo de Perú fue de 44; además se observó que durante el cultivo de anteras presentaron plantas mixoploides (Sánchez, 2014). En el mismo año

un trabajo también colombiano, enfocado en la caracterización de genotipos resistentes al hongo *Fusarium oxysporum*, reportó que para las accesiones de Colombia, Sudáfrica y de la India presentaban un número cromosómico de 2n=4x=48; además informó un número cromosómico de 2n=2x=24 para una accesión de origen Polaco (Liberato et al., 2014).

Otros estudios en Brasil, determinaron que las poblaciones de aguaymanto de origen andino (Colombia y Perú) comercializadas en Brasil, así como también las poblaciones cultivadas en la región sur del país, serían tetraploides 2n=4x=48 (Trevisani et al., 2018). Por otro lado, algunos estudios fueron más allá de solo realizar el conteo de cromosomas, y llevaron su análisis a las características morfológicas del complemento cromosómico de la especie. Por ejemplo en un estudio de especies de *Physalis* en Nigeria, se determinó que la fórmula cariotípica de *Physalis peruviana* diploide 2n=48 fue la siguiente: 4M + 6m + 1sm + 1st (Azeez y Faluyi, 2019). Un estudio similar ocurrió en Perú, donde se caracterizó citogenéticamente a 3 ecotipos cultivados de la región de Cajamarca determinando para cada uno de ellos una fórmula cariotípica propia, además se reportó que el número cromosómico más frecuente para los 3 ecotipos fue de 2n = 4x = 48, sin embargo las otras frecuencias observadas presentaban diferentes números cromosómicos en todos los ecotipos, traduciéndose en una aneuploidia somática (Carbajal et al., 2021).

La escasez de estudios sobre la fórmula cariotípica de aguaymanto, se debe a que sus cromosomas son numerosos y presentan una morfología muy similar entre ellos, lo cual genera mucha dificultad a la hora del apareamiento de los cromosomas homólogos. Estas características hacen que técnicas de tinción de citogenética clásica no permitan tener un análisis más fino de los cromosomas, limitando así la información citogenética que puedan obtener los investigadores de las poblaciones de aguaymanto en estudio.

Estudios más recientes con técnicas de citogenética molecular, han demostrado tener utilidad en la caracterización de ecotipos cultivados. Así mediante el mapeo del locus

ribosomal 5s utilizando FISH, es posible determinar si hay diferencia genética entre ecotipos cultivados prescindiendo del análisis de la morfología de todo el complemento cromosómico (Siles et al., 2021).

2.6. Marcadores ADN ribosomales

2.6.1 Ribosomas

Los ribosomas están compuestos por proteínas vinculadas al ARN ribosómico (ARNr), a su vez estos están conformados por dos sub unidades: una subunidad mayor y una subunidad menor. Se ha observado que hay diferencias entre los ribosomas procariotas, eucariotas, mitocondriales y plastidiales; en cuanto a su coeficiente de sedimentación expresados en svedberg, cuyo símbolo es el "S", este es una medida que se utiliza en ultracentrifugación calculándose al dividir la velocidad constante de sedimentación en metros/segundos de una macromolécula por la aceleración aplicada de la centrífuga en metros/segundo^2, el resultado tendrá dimensiones de tiempo svedberg (S) y no se pueden sumar entre sí, debido a que dependen de la masa y de la forma que tenga la molécula (Correia y Stafford, 2015). Teniendo en cuenta este concepto se ha observado que los ribosomas eucariotas presentan un valor de 80S, con la subunidad mayor de 60S (formado por aproximadamente 49 proteínas y ARNr de 5s ,5.8s y 28/26s) y la sub unidad menor de 40S (Formado por aproximadamente 33 proteínas y ARNr de 18s); por otro lado los ribosomas procariotas presentan un valor de 70S, con la subunidad mayor de 50S (formado por aproximadamente 34 proteínas y ARNr de 5s y 23s) y la sub unidad menor de 30S (Formado por aproximadamente 21 proteínas y ARNr de 16s) (Wilson y Doudna, 2012). Estas moléculas de ARNr están codificadas por genes de ARNr que se encuentran en el genoma de la célula, los cuales son comúnmente denominados ADN ribosómico (ADNr).

2.6.2 Características del ADN ribosómico (ADNr)

El ADNr es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas que codifican para los ARNr. Estos ADNr constituyen una gran región de secuencia de ADN repetitivo dentro de los cromosomas, es decir se encuentran distribuidos en repeticiones en tándem a lo largo de una región en el genoma. Se ha observado que los ADNr están organizados en dos familias de genes altamente repetidas que se presentan en grupos repetidos en tándem: Una familia mayor que codifica para varios genes ribosomales denominada ADNr 45s y una familia menor ADNr 5s que codifica para el ARN 5s (Abd El-Twab y Kondo 2012), también se ha evidenciado que el ADNr es uno de los locus genómicos con una mayor actividad transcripcional (Salim y Gerton, 2019). Por otro lado, se ha observado que la disposición en tándem de repeticiones, combinada con las altas tasas de transcripción en los loci de ADNr y la dificultad de replicar secuencias repetitivas hace que el ADNr sea inherentemente inestable y particularmente susceptible a grandes variaciones en el número de copias repetidas (Salim y Gerton, 2019). Este aumento en el número de copias se ha atribuido a recombinaciones desiguales entre los loci homólogos y los homeologos (Rosato et al, 2016). Además se ha demostrado que las regiones de ADNr son objetivos frecuentes para la inserción de elementos móviles, los cuales promueven la dinámica evolutiva de los loci de ADNr no solo a través de la radiación de especies sino también durante la diferenciación, produciendo reordenamientos cariotípicos que pueden favorecer los procesos de especiación, lo cual conllevaría hacia la diferenciación genética (Pedrosa-Harand et al, 2006). Estas características del ADNr desde un punto de vista de marcador citogenético, permiten la caracterización de cromosomas y genomas al evaluar la posición y número de los loci presentes en un cariotipo con el fin de evaluar la variabilidad inter e intraespecífica entre especies a nivel citogenético (Yagi et al, 2015). Es por eso que la detección de los locus ADNr 45s y 5s mediante la técnica de FISH es muy utilizado en plantas, siendo estos los marcadores citomoleculares más utilizados para estudios evolutivos.

La estructura genética de estos ADN ribosómicos es la siguiente:

- **ADNr 45s**

  Alternativamente llamado ADNr 35s (Garcia et al., 2017; Galián et al., 2012). Este ADNr estará conformado por genes que codifican para el ARNr 18S, 5.8S y 26/28s (26S en plantas y 28S en animales), con regiones espaciadoras dispuestas entre estos (Kuzoff et al., 1998). De acuerdo a la organización estructural del ADNr 45s, este estará dispuesto de la siguiente manera: Un elemento de control aguas arriba (UCE), promotor central (CP), espaciador transcrito externo (ETS), ADNr 18S, espaciador transcrito interno (ITS), ADNr 5.8S, ITS, ADNr 26/28s, ETS; además cada repetición de ADNr 45s estará separa por un espaciador intergénico (IGS) (Karahan et al., 2015) (Figura 1).

  Además se sabe que el ADNr 45s se encuentra en la región organizadora nucleolar, el cual es una de las regiones que se relaciona con una alta actividad transcripcional y la formación del nucleolo en la etapa de interfase (Long y Dawid, 1980; Lopez et al., 2021).

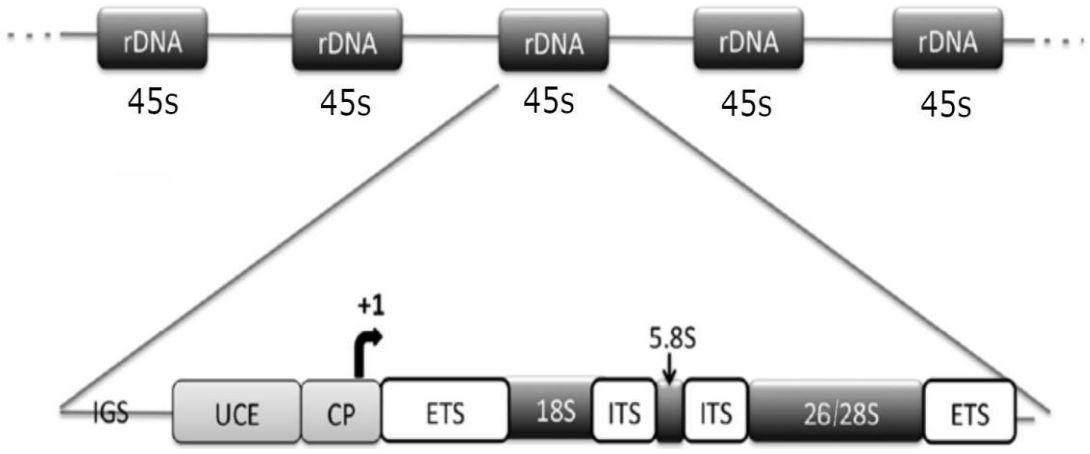

Figura 1. Estructura genética de las unidades ADNr 45s. La flecha que apunta hacia adentro con el número +1, representa el sitio de inicio de la transcripción. IGS = espaciador intergénico, UCE = elemento de control aguas arriba, CP = promotor central, ETS = espaciador transcrito externo, ITS = espaciador interno transcrito. (Modificado de Karahan et al., 2015)

- **ADNr 5s**

La estructura del ADNr 5s es más simple en comparación al ADNr 45s, este ADNr está conformado por el gen 5s y por un espaciador no transcrito (NTS) que separa un gen de otro de tamaño variable entre cada especie, cabe destacar que hay regiones flanqueantes del gen 5s rDNA que están involucradas en la regulación de la transcripción, pero están dentro del NTS. Por ejemplo en la región flanqueante 5′ se encontrará la caja TATA que permite la unión del ARN polimerasa (Volkov et al., 2001; Douet y Tourmente, 2007) (Figura 2).

A diferencia del ADNr 45s, el 5s no forma parte de la región organizadora nucleolar y por ende no está relacionado con la formación de los nucleolos (Weber, 1978)

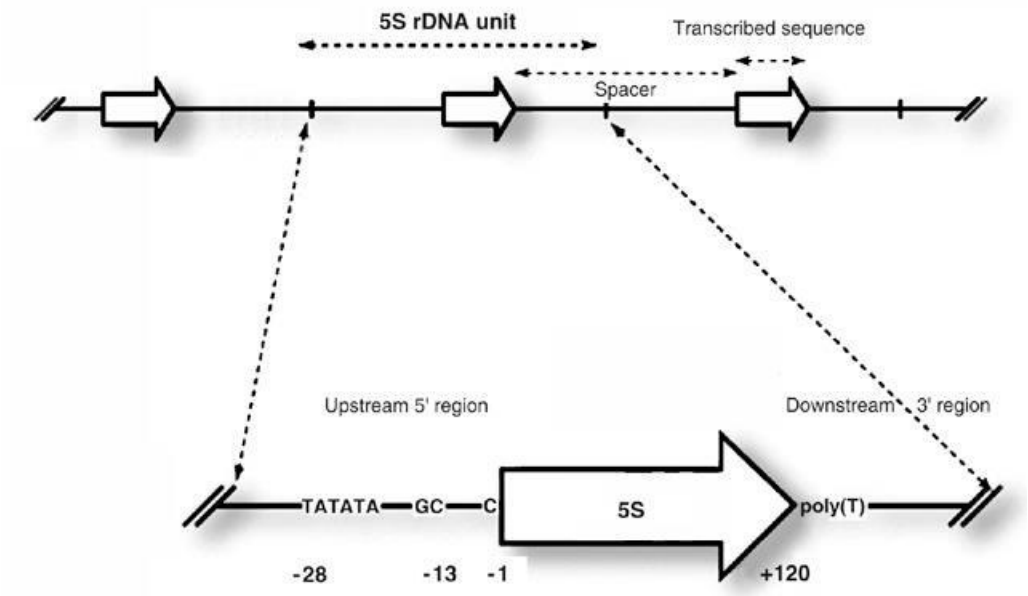

Figura 2. Estructura genética de las unidades ADNr 5s. La estructura muestra a la secuencia transcribible 5s junto a sus regiones flanqueantes que contienen regiones reguladoras de inicio y termino de la transcripción, los cuales a la vez pertenecen a las secuencias espaciadoras de la unidad de repetición del ADNr 5s. (Modificado de Douet y Tourmente, 2007)

2.6.3 Aplicación del uso del ADNr en el estudio citogenético molecular en plantas

Debido a las limitación de las técnicas de tinción convencional de la citogenética clásica que se ha observado durante el establecimiento del cariotipo basado por el tamaño, posición del centrómero y patrón del bandeo en especies que presentan un tamaño relativamente pequeño y morfología muy similar entre sus cromosomas; las técnicas de citogenética molecular empleando sondas para ubicar los locus de ADNr 5s y 45s han permitido tener una mejor caracterización citogenética entre las especies de plantas que presentan estas limitaciones mencionadas (Arroyo, 2016). Esto gracias a que la caracterización citogenética solo se centra en el polimorfismo que presentan los cromosomas que contengan los sitios de ADNr, de esta manera también facilita el estudio de las especies que presentan un número de cromosomas muy alto, como se ha visto en el estudio de Su et al. (2020) en plantas poliploides. En el estudio de estos autores, se caracterizaron 76 cultivares de camotes de pulpa púrpura, donde la mayoría de estos eran hexaploides con un número de 90 cromosomas, siendo estos de morfología similar y de tamaño muy pequeño limitando su caracterización a este nivel. Por lo tanto, los autores optaron por el mapeo de los sitios ADNr 45s y 5s mediante FISH, el cual permitió la caracterización citogenética de los cultivares y encontrar diferencias entre estos al comparar los número de sitios de ADNr, siendo el 45s más variable. Además solo se limitaron en analizar los cromosomas que presentaban estos sitios de ADNr, el cual es un número mucho menor a los 90 cromosomas que presentaba esta especie.

Por otro lado, la ubicación de los sitios ADNr en los cromosomas también han sido utilizados para estudiar las relaciones taxonómicas entre especies del mismo género o entre otro género, como en el estudio de Rego et al. (2009); donde se evaluó especies del género *Solanum*, el cual es caracterizado por poseer cariotipos aparentemente conservados en número y forma de cromosomas, siendo difícil su estudio con técnicas

de citogenética convencional. Pero gracias a la caracterización citomolecular utilizando los marcadores ADNr los autores pudieron analizar las relaciones citotaxonómicas de 16 especies del género *Solanum* y 2 especies externas de la misma familia, obteniendo como resultado discrepancia con las relaciones de filogenia molecular, sugiriendo utilizar los datos citogenéticos para la reformulación de las relaciones taxonómicas de estas especies.

También se ha observado que el mapeo de los sitios ADNr puede dilucidar historias evolutivas cromosómicas entre especies silvestres y cultivadas. Como lo hicieron en el estudio de Yagi et al. (2015). Donde gracias al mapeo de los loci de ADNr 5s y 45s a través de FISH, se pudo lograr la caracterización de los cromosomas que presentaban hibridación en cada especie y de esta manera, mediante un soporte filogenético, pudieron inferir hasta 2 posibles pasos de reordenamiento cromosómico durante la evolución de las especies que presentaban mayor número de locis de ADNr.

Debido a su gran capacidad de caracterizar citogenéticamente las especies mediante el mapeo de las regiones ADNr, su uso en la exploración de recursos genéticos y en los programas de fitomejoramiento apoyarían en el proceso de genotipificación de las poblaciones silvestres y cultivadas (Herrera, 2007). También tendría un potencial uso durante el seguimiento de la estructura de los genomas híbridos y su progenie para observar la compatibilidad y estabilidad citogenética en los procesos de hibridación (Benlioglu y Adak, 2019).

2.7 Hibridación Fluorescente In Situ (FISH)

Los orígenes de esta técnica se basan a finales de los años 60 con el uso de sondas de ARN marcadas radioactivamente, sin embargo debido a limitaciones técnicas relacionadas a la detección autoradiográfica no fue muy utilizado en las investigaciones. La técnica de FISH como tal tendría sus inicios en los años 90, debido al desarrollo y mejora en los sistemas de microscopía de fluorescencia, y al desarrollo de nuevos

metodologías y productos que permitían el marcaje de sondas para hibridación basados en una gran variedad de fluorocromos; a esto se suma el desarrollo de software especializado en el procesamiento de imágenes. Todo lo anterior permitió a los investigadores contar con métodos rápidos y precisos para la creación de la sonda y su detección, haciendo entrar a la citogenética a la era molecular y permitiendo ampliar las investigación en biología y medicina (Herrera, 2007; Nath y Johnson, 2000).

La técnica de FISH se basa en la complementariedad de la secuencia del ADN diana con secuencias específicas de ADN o ARN marcados con fluorocromos, los cuales son denominados sondas. Estas sondas hibridarán en el ADN diana y mediante un microscopio de fluorescencia podrán ser visualizados, esto gracias a que el microscopio contara con un set de filtros específicos para poder excitar el fluorocromo y visualizar su señal fluorescente; para posteriormente analizarlos mediante un software de procesamiento de imágenes (Nath y Johnson, 2000). En base a su fundamento, el FISH ofrece tres ventajas principales: Permite tener una alta sensibilidad y especificidad al momento de reconocer secuencias de ADN o ARN de interés; tener una aplicabilidad directa a nivel de cromosomas en metafase y también a núcleos en interfase; y la visualización de señales de hibridación a nivel de una sola célula (Cui et al., 2016).

Para poder iniciar los protocolos de FISH en plantas, es necesario tener previamente a las placas metafásicas con cromosomas disgregados en las láminas portaobjetos y las moléculas de ADN o ARN marcadas con el fluorocromo (sonda).

- **Obtención de las placas metafásicas**

  Las placas metafásicas con cromosomas disgregados en las láminas portaobjetos son denominadas en algunos laboratorios como “láminas en blanco”. Estas láminas en blanco son producto de protocolos citogenéticos convencionales que permiten tener una muestra de tejido con las células dispersas y detenidas en la metafase, estas pueden ser obtenidas mediante la

técnica de Squash (Aguilera et al., 2016; Mandáková y lysak, 2016) o por goteo (Aliyeva et al., 2015; Benn y Delach, 2008). Ambas tienen la particularidad de empezar con una muestra de tejido fijada que presenta un alto porcentaje de mitosis previamente tratadas con un agente inhibidor de la formación del huso acromático, como la colchicina (Taylor, 1965).

- **Obtención de la Sonda**

  El etiquetado de moléculas de ADN para la creación de la sonda puede ser mediante la incorporación de nucleótidos ligados a fluoróforos o incorporando moléculas que serán detectadas posteriormente por otras moléculas secundarias que estén ligados a fluoróforos. Uno de los métodos más fáciles de implementar para el marcado es el de Nick Translation. Este procedimiento genera sondas uniformemente etiquetadas y también permite tener un control del tamaño de la sonda que se desee obtener. Su fundamento radica en generar nicks o el rompimiento de una hebra de ADN por la acción de una DNAsa I generando que el extremo 3'-OH dentro de una hebra del ADN quede libre, mientras el ADN polimerasa I va sintetizando ADN complementario a la hebra intacta en una dirección 5' a 3' utilizando los extremos 3'-OH generados por el nick como cebador. Esto se da gracias a la actividad exonucleasa 5' a 3' que posee la ADN polimerasa I, el cual va eliminando los nucleótidos en la dirección de la síntesis de la nueva cadena de ADN. De esta manera al sintetizar este nuevo ADN se van incorporando nucleótidos marcados con haptenos o fluoróforos que se hayan elegido para el marcaje. Este método de Nick Translation va a generar fragmentos de ADN marcados de un tamaño menor al ADN original, lo cual no influirá en el rendimiento de la sonda marcada en el FISH (Gupta y Kumar, 2012).

En el protocolo del FISH se pueden identificar cuatro etapas fundamentales: Los lavados pre-hibridación, hibridación, lavados post-hibridación y la detección (Poggio et al., 2000a; Eisel et al., 2008).

- **Lavados pre-hibridación**

  Etapa que prepara a la lámina en blanco para los posteriores pasos del FISH, mediante la eliminación de ARN y el refuerzo de la fijación de la muestra con paraformaldehído (Eisel et al., 2008).

- **Hibridación**

  En esta etapa las sondas hibridan en las regiones del ADN complementario. Para esto se crea una solución de hibridación que contendrá a la sonda con reactivos que faciliten su penetración a las células y su hibridación con el ADN diana. Para la penetración de la sonda a las células, la solución de hibridación contendrá detergentes a baja concentración como el dodecilsulfato sódico (SDS), que ayudará a desestabilizar la membrana celular. Para favorecer la hibridación, la solución contendrá formamida, el cual disminuye la Tm del ADN favoreciendo la apertura de las hebras de ADN para que la sonda entre en la región complementaria; sulfato de dextrano, este quita las moléculas de agua a las otras macromoléculas haciendo que aumente la concentración de la sonda y por ende genere mayores tasas de hibridación; solución salina citratada (SSC), este buffer aportará los cationes monovalentes a la solución de hibridación, los cuales interactúan electrostáticamente con los fosfatos del ADN haciendo que la repulsión electrostática entre las dos cadenas disminuya generando una mayor estabilidad durante la hibridación de la sonda; ADN monocatenario de esperma de salmón, este componente actúa como un agente bloqueante, el cual disminuye cualquier hibridación inespecífica de la sonda al unirse en las demás regiones del ADN (Brammer et al., 2013; Eisel et al. 2008). Luego esta solución de hibridación es colocada encima de la muestra y llevada a un programa de temperaturas, todo esto

con el fin de denaturar las hebras de ADN y así la sonda pueda hibridar con su complementario. Además la temperatura óptima en este proceso dependerá de la especificidad que presenta la sonda (McCoy et al., 2019).

- **Lavados Post-hibridación**

  En este punto el concepto de astringencia toma mucha importancia, este se define como el grado que deben tener los lavados para poder eliminar las uniones inespecíficas de las sondas en otras regiones no homólogas durante el paso de hibridación (Poggio et al., 2000b; Pulido, 2010; Kopcow et al., 2009). Para esto juegan un papel muy importante las concentraciones de sales, la temperatura y la concentración de formamida durante los lavados. Una astringencia alta hará que la la señal de la sonda se vea disminuida, por otro lado si la astringencia es demasiado baja habrán señales inespecíficas en otras regiones del cromosoma y no habrá una correcta reproducibilidad durante el procesamiento de otras láminas en blanco.

- **Detección**

  En este paso final se procede con la detección de las sondas que han sido marcadas con un hapteno y necesiten ser detectados con una molécula secundaria ligada a un fluorocromo. Si la sonda fue marcada con un nucleótido ligado a un fluorocromo, este paso se simplifica solo al montaje de la lámina. La detección de las sondas con moléculas secundarias puede ser con anticuerpos o moléculas de unión específica ligados a fluorocromos. Un ejemplo particular de este último caso es la afinidad que tiene la biotina con la avidina (Speel et al., 1992).

Luego de estos 4 pasos de FISH, se realiza la contratinción y el montaje de láminas. La contratinción se realiza con DAPI, el cual es un colorante fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN (Kapuscinski, 1995). Después el montaje se realiza con una solución que contenga antifade, el cual es un compuesto químico que desacelera la pérdida de fluorescencia o fotoblanqueo (Ravikumar et al., 2014). Luego del montaje, las láminas están listas para observarse en un microscopio de fluorescencia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar mediante citogenética molecular poblaciones silvestres y cultivadas de *Physalis peruviana* de las regiones de Ayacucho y Cajamarca utilizando sondas para los loci ADNr 5s y 45s.

3.2 Objetivos específicos

- Estandarización del protocolo de marcado, detección e hibridación de las sondas para los loci ADNr 5s y 45s para *Physalis peruviana*.

- Identificar los sitios de ADNr 5s y 45s en los cromosomas mediante FISH (Hibridación Fluorescente *in situ*).

- Identificar la morfología de los cromosomas que presentan ADNr de *Physalis peruviana* mediante la tinción DAPI.

- Evaluar la posición, intensidad de fluorescencia y número de sitios de ADNr 5s y 45s en los cromosomas de las especies silvestres y cultivadas.

4. HIPOTESIS Y VARIABLES

4.1 Hipótesis nula

No es posible diferenciar y caracterizar poblaciones silvestres y cultivadas mediante los loci ADNr 5s y 45s de *Physalis peruviana* de los departamentos de Ayacucho y Cajamarca.

4.2 Hipótesis alternativa

Si es posible diferenciar y caracterizar poblaciones silvestres y cultivadas mediante los loci ADNr 5s y 45s de *Physalis peruviana* de los departamentos de Ayacucho y Cajamarca.

4.3 Variables Independientes

ADNr 5s y 45s en los cromosomas de las poblaciones de *Physalis peruviana*.

Indicador: Presencia o ausencia de los sitios ADNr 5s y 45s a través de la hibridación fluorescente de las sondas específicas para cada locus.

4.4 Variables Dependientes

- Posición de los ADNr 5s y 45s en los cromosomas de *Physalis peruviana*.

Indicador: Ubicación de las señales fluorescentes en los cromosomas producto de la hibridación de las sondas para cada locus.

- Intensidad de fluorescencia de los sitios ADNr 5s y 45s en los cromosomas de *Physalis peruviana*.

Indicador: Evaluación cuantitativa de los píxeles en las zonas de fluorescencia de la hibridación de las sondas en las fotografías de los campos observados en el microscopio de fluorescencia.

- Número de sitios de los ADNr 5s y 45s en los cromosomas de *Physalis peruviana*. Indicador: Conteo del número de las señales fluorescentes en los cromosomas producto de la hibridación de las sondas para cada locus.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugares de colecta

Se colectaron muestras de poblaciones cultivadas y silvestres de los departamentos de Cajamarca, en el 2015 y Ayacucho, en el 2018 (Tabla 1).

Tabla 1. Datos geográficos de los lugares de colecta

Población	Ubicación			Altitud	Coordenadas	
	Departamento	Provincia	Distrito	(msnm)	Latitud	Longitud
Cultivada	Ayacucho	Huanta	Huamanguilla	3085	S°13°01'50.9"	O°74°10'14.3"
	Cajamarca	San Pablo	Tumbaden	2662	S°7° 5'43.9"	O°78°49'13.9"
Silvestre	Ayacucho	Huamanga	Quinua	3000	S°13°03'53.5"	O°74°09'13.1"
	Cajamarca	San Marcos	Pedro Gálvez	2716	S°7°20'47.3"	O°78°06'00.3"

5.2. Material Biológico Colectado

Se recolectaron un total de 30 frutos entre todas las plantas maduras en cada uno de los lugares de colecta, estos frutos fueron almacenados en un recipiente térmico hasta su traslado al laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Se llevaron ejemplares de las muestras al Museo de Historia Natural de la UNMSM, las que fueron identificadas como *Physalis peruviana* L. (Constancias 224-USM-2015 y 001-USM-NHN-2022).

5.3. Material de Laboratorio

5.3.1. Equipos

- Microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axio Scope A1)
- Cámara digital para microscopio 10MP (Euromex, cemex-10 pro)
- Termociclador (Eppendorf, Mastercycler pro)
- Hibridizador (Biobase, HS-500)
- Transiluminador (Cleaver Scientific, DUOVIEW254/365)

- Cámara de electroforesis horizontal
- Incubadora (Biobase)
- Cámara de flujo laminar (Airtech)
- Nanodrop (Eppendorf)
- Microscopio óptico (Zeiss, PrimoStar)
- Micropipetas
- Microcentrífuga (Eppendorf)
- Balanza analítica (AND, HR-250AZ)
- Vórtex

5.3.2. Materiales de Vidrio

- Cubetas o complin para tinción de láminas
- Láminas portaobjeto y cubreobjetos
- Beakers
- Probetas
- Placas Petri

5.3.3 Kits Comerciales y Enzimas

- GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific™)
- BioNick™ Labeling System (Invitrogen™)
- DIG-Nick Translation Mix (Roche)
- HotStart DNA Polymerase (ABM)
- Pectinasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich)
- Celulasa de Aspergillus niger (Sigma-Aldrich)
- Ribonucleasa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich)
- SlowFade™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen™)
- GF-1 Plant DNA Extraction Kit (vivantis)

5.3.4. Moléculas para detección de la Sonda

- Anti-Digoxigenin-Rhodamine, Fab fragments (Roche)
- Avidin, NeutrAvidin™, Oregon Green™ 488 conjugate (Thermo Scientific™)

5.3.5. Reactivos

- Citrato de Sodio
- Cloruro de Sodio
- Ácido Cítrico monohidratado
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- 4 ',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
- Etanol
- Ácido Acético Glacial
- ADN monocatenario de testículos de salmón (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Solución de Sulfato de Dextrano al 50%
- Tween 20
- Formamida
- Paraformaldehído
- Colchicina
- Agarosa
- Tris Base
- Ácido Bórico
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

5.4. Obtención de las placas metafásicas o las láminas en blanco

5.4.1. Extracción de las semillas de Aguaymanto

Se colocaron los frutos sin el cáliz en agua a 40°C en un vaso precipitado de 500ml para posteriormente ser aplastados suavemente con las manos hasta que las semillas fueran liberadas. Luego con la ayuda de una coladera, se tamizaron las semillas para poder quitar los restos de pulpa que pudieron haberse quedado impregnados. Finalmente las semillas fueron lavadas con agua destilada, secadas por 3 días encima de papeles toalla y almacenadas a 4°C dentro de tubos de 10mL, hasta su uso.

5.4.2. Germinación de semillas y fijación de raíces

Se siguió el protocolo de Carbajal (2018) con algunas modificaciones: Las semillas fueron sembradas sobre papel filtro humedecido con agua destilada en placas Petri a temperatura ambiente, manteniendo siempre la humedad del papel filtro durante el proceso. Una vez que las semillas empezaban a germinar luego de 4 a 5 días, durante las 10:00 y 12:00 horas del día se seleccionaban las que presentaban una raíz de longitud aproximada de 4mm para ser sometidas a un tratamiento con colchicina al 0.03% durante 80 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad; cumplido este tiempo las semillas pasaron a un proceso de hipotonización con agua destilada por 60 minutos a 37°C. Luego para fijar las semillas con su raíz, fueron colocados dentro de tubos de 1.5ml que contenía una solución de etanol: ácido acético (3:1) por lo menos durante 24 horas a -20°C, hasta su posterior uso.

5.4.3. Preparación de cromosomas vegetales a partir de ápices radicales

Se siguió parte de los protocolos de Aguilera et al. (2016) y Aliyeva et al. (2015): Las raíces fijadas se lavaron en agua destilada fría dos veces por 5 minutos, seguido de dos lavados por 5 minutos cada una en buffer citrato frío (0,01 M a pH 4.6), todos los lavados fueron realizados con agitación con ayuda de un vortex. Después, las raíces fueron transferidas a una solución enzimática durante 1 hora a 37°C, esta solución estaba compuesta de celulasa al 2% (de *Aspergillus niger*, Sigma) y pectinasa líquida al 10%

(de *Aspergillus niger*, Sigma), disueltas en 40% de glicerol en buffer citrato. Posteriormente, las raíces fueron lavadas cuatro veces por 5 minutos con buffer citrato frio y dos veces en etanol a 90° por 5 segundos, también con agitación. Inmediatamente después, cada raíz fue trasladada a una lámina portaobjetos, se cortó el ápice de la raíz, se echó una gota de ácido acético al 45%, se colocó encima una laminilla y se realizó la técnica del "squash".

Las láminas fueron observadas en un microscopio óptico colocando la apertura del condensador a su mínimo nivel para poder observar las células y sus cromosomas de manera más detallada, esto con el fin de poder seleccionar las láminas que presentaban metafases con cromosomas adecuadamente disgregados. Una vez seleccionado las mejores láminas, se procedió a levantar la laminilla con la ayuda de un bloque de hielo seco colocando la lámina por 20 minutos sobre él y, posteriormente, levantando la laminilla con la ayuda de un bisturí. Finalmente, las láminas se sumergieron en etanol de 80°, se dejaron secar por 3 horas a temperatura ambiente y fueron almacenadas sumergiéndolas en etanol absoluto a -20°C hasta su uso.

5.5. Obtención de las sondas ADNr 5s y 45s

5.5.1 Extracción de ADN genómico

Se utilizaron plántulas de Aguaymanto como material biológico para obtener ADN genómico, estas fueron obtenidas de un proceso de germinación en papel filtro humedecido con agua destilada en una placa Petri. Para la extracción se usó el kit de extracción de ADN vegetal GF-1 Plant DNA Extraction Kit (v*i*vant*i*s). El stock de ADN genómico resultante fue cuantificado en un nanodrop, alicuotado y almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

5.5.2. Amplificación del ADNr

Para la amplificación del ADNr 5s, se usó los primers pr5S14 (5′-GGCGAGAGTAGTACTAGGATCCGTGAC-3′) y pr5S15 (5′-GCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3′) reportado previamente en el estudio de

Volkov et al. (2001). La PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones: 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. Para la estandarización del programa de PCR, se tomó como base lo siguiente: 95 °C durante 9 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 48-62 °C durante 30 segundos y de 72 °C durante 60-30 segundos, y una extensión final de 72 °C durante 4 minutos.

Para la hibridación y detección del locus ADNr 45s en los cromosomas, se optó por usar al gen 18s como sonda, esto debido a que el locus ADNr 45s es demasiado grande para poder amplificarlo completamente y por lo tanto marcarlo de manera eficaz, también se sabe que el gen 18s se encuentra dentro de la estructura génica del ADNr 45s (Karahan et al., 2015). Además dentro de la base de datos de Plant rDNA database, el mapeo del 18s es considerado para ubicar el locus del ADNr 45s (Garcia et al., 2017). Por lo tanto para poder amplificar el 18s se utilizaron los primers universales para eucariotas F-566 (5′-CAGCAGCCGCGGTAATTCC-3′) y R-1200 (5′-CCCGTGTTGAGTCAAATTAAGC-3′) reportados previamente en el estudio de Hadziavdic et al. (2014). La reacción de PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones: Buffer de PCR 1X, MgCl 1.5 mM, dNTPs 0.2 µM, 0.2 µM de cada primer, 1U de Taq polimerasa y 30 ng de ADN genómico, en un volumen de reacción de 20 µl. Para la estandarización del programa de PCR, se tomó como base lo siguiente: 95°C durante 9 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 50-60°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos, y una extensión final de 72°C durante 4 minutos.

Después de la PCR de ambos ADNr 5s y 18s, los amplicones fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, purificados con el kit GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific™) y cuantificados en el nanodrop.

5.5.3. Marcado de los amplicones de ADNr

Los productos purificados y cuantificados de la PCR 5s y 18s fueron marcados con moléculas de biotina y digoxigenina respectivamente, mediante la técnica molecular

denominada Nick Translation. Para esto se usó el kit comercial BioNick Labelling System de Invitrogen para el marcado del 5s y el kit DIG-Nick Translation Mix de ROCHE para el marcado del 18s, siguiendo las instrucciones de los fabricantes en ambos casos. Una vez obtenidas las sondas para ubicar los loci de ADNr, estos fueron cuantificados en el nanodrop, alicuotados y almacenados a -20°C hasta su uso.

5.6. Hibridación Fluorescente in Situ (FISH)

Para este procedimiento se tomó como base el protocolo para FISH reportado por Poggio et al (2000a) con algunas modificaciones, cabe destacar que todos los lavados fueron realizados en cubetas de tinción con agitación moderada:

1) Lavados pre-hibridación

   Las láminas en blanco que contenían los preparados cromosómicos adecuados, fueron incubadas en 100 mg/ml de RNAsa en 2x SSC durante 1 hora a 37°C en el hibridizador, esto se hizo colocando 200µl de la solución sobre las muestras que contenía las láminas. Una vez cumplido el tiempo, las láminas fueron lavadas tres veces en 2x SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se reforzó la fijación de las láminas al tratarlas en paraformaldehido al 4% (p/v) recién preparado durante 10 minutos. Después fueron lavadas en 2x SSC por 5 minutos tres veces y deshidratadas en una serie graduada de etanol de 70°,90° y 100°, por 3 minutos cada una. Finalmente las láminas fueron secadas a temperatura ambiente por 1 hora.

2) Hibridación de las sondas para los loci ADNr 5s y 45s

   Se preparó una solución de hibridación que contenía los siguientes componentes diluidos en 2x SSC en un volumen de 30µl por lámina: 50% (v/v) de formamida desionizada, 10% (p/v) dextrano sulfato, 0.1% (p/v) SDS, 0.3 mg/ml de ADN de esperma de salmón, 50 ng de sonda ADNr 5s y 45s. La solución de hibridación se desnaturalizó durante 15 minutos a 75°C y luego se enfrió a 4°C por 5 minutos.

Después, la solución fue colocada sobre las muestras de las láminas y posteriormente cubiertos con un cubreobjetos de plástico. Luego, las láminas fueron llevadas al hibridizador con un programa de temperatura de 75°C durante 7 minutos, 55°C por 6 minutos, 45°C por 5 minutos y 37ºC durante 12 horas.

3) Lavados post hibridación

Después de la hibridación, los cubreobjetos de plástico fueron retirados cuidadosamente sumergiendo las láminas en 2x SSC a 42°C durante 5 min. Luego las láminas fueron lavadas rigurosamente en formamida al 20% en 0.1x SSC a 42°C durante 10 minutos. Posteriormente fueron lavadas en 0.1x SSC a 42°C durante 5 minutos, luego en 2x SSC también por 5 min a 42°C y finalmente lavadas en un buffer de detección (4x SSC, Tween 20 al 0,2% (v/v)) durante 5 minutos por 3 veces, siendo el primer lavado realizado a 42°C y los dos restantes a temperatura ambiente.

4) Detección de la sonda

Para detectar las sondas marcadas con biotina y digoxigenina, las láminas se trataron con un conjugado de neutravidina-Oregón-Green 488 (fluorescencia verde, Thermo Scientific™) y de Anti-Digoxigenina-Rodamina (fluorescencia roja, Roche) respectivamente. Para poder tratar a las láminas con estos conjugados, en primer lugar fueron tratadas con BSA al 2,5% (p/v) en buffer de detección por 3 minutos. Después, se incubó las muestras con una solución de 100µl que contenga una concentración de 10ug/mL de los dos conjugados descritos anteriormente disueltos en BSA al 2,5% (p / v) en buffer de detección durante 1 hora a 37°C en el hibridizador. Posteriormente, las láminas fueron lavadas 3 veces en buffer de detección por 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad.

5) Contratinción y montaje de láminas

Luego del paso anterior, las láminas se dejaron secar por 15 minutos y después se colocó 25ul del medio de montaje SlowFade™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen™)

sobre las muestras, el cual contenía el antifade y el DAPI al mismo tiempo, después se cubrió con un una lámina cubreobjetos y se sellaron con Entellan. Las láminas se dejaron como mínimo 12 horas antes de su observación en el microscopio.

6) Observación y fotografía en microscopio de Epifluorescencia

   Las láminas fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia de marca Zeiss, Axio Scope A. Para la observación de la tinción con DAPI se utilizó el par de filtros de excitación BP 340/30 y emisión BP 510/90, para el Oregón Green 488 se usó los filtros de excitación BP 470/40 y emisión BP 540/50; y para la Rodamina se usó el de excitación BP 560/40 y emisión BP 630/75. Las fotografías fueron realizadas con una cámara de 10MP acoplada al microscopio.

7) Procesamiento y análisis de imágenes

   Para poder superponer las fotos tomadas para el DAPI, Oregon Green 488 y Rodamina e individualizar los cromosomas que presentaban hibridación; se utilizó el programa de libre acceso GIMP 2.10.14. Solo se consideró a los campos metafásicos que presentaban 48 cromosomas, para evitar el posible sesgo producido por la aneuploidía somática que presenta la especie (Carbajal et al., 2021).

   Se realizaron las mediciones morfológicas de los cromosomas y creación de ideogramas mediante el programa IdeoKar1.2 (Mirzaghaderi y Marzangi, 2015).

   Para la cuantificación cuantitativa de fluorescencia de las señales de sondas ADNr, se utilizó el programa de libre acceso ImageJ. Esto se realizó siguiendo las instrucciones reportadas por Fitzpatrick (2021).

5.7. Análisis Estadístico

La administración de los datos y el análisis descriptivo fue realizada con el programa Excel 2013. Los datos continuos fueron presentados como el promedio ± la desviación estándar. Los análisis de estadística inferencial se realizaron con herramientas online de libre acceso: El test de Shapiro-Wilk fue realizado con el calculador de Statistics-Kingdon (www.statskingdom.com), La prueba de ANOVA, el test HSD de Tukey y el test

de Kruskal-Wallis fue realizado con las herramientas de Social-Science-Statistics (www.socscistatistics.com); y las pruebas de t Student fueron realizados con las opciones de análisis de datos de Excel 2013. Valores p menores a 0.05 ($p < 0.05$) fueron considerados como estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Obtención de láminas en blanco

Al seguir el protocolo citogenético, se obtuvieron las láminas en blanco. Estas contenían células metafásicas donde los cromosomas se encontraban disgregados y con el citoplasma limpio, características esenciales para los posteriores tratamientos del FISH.

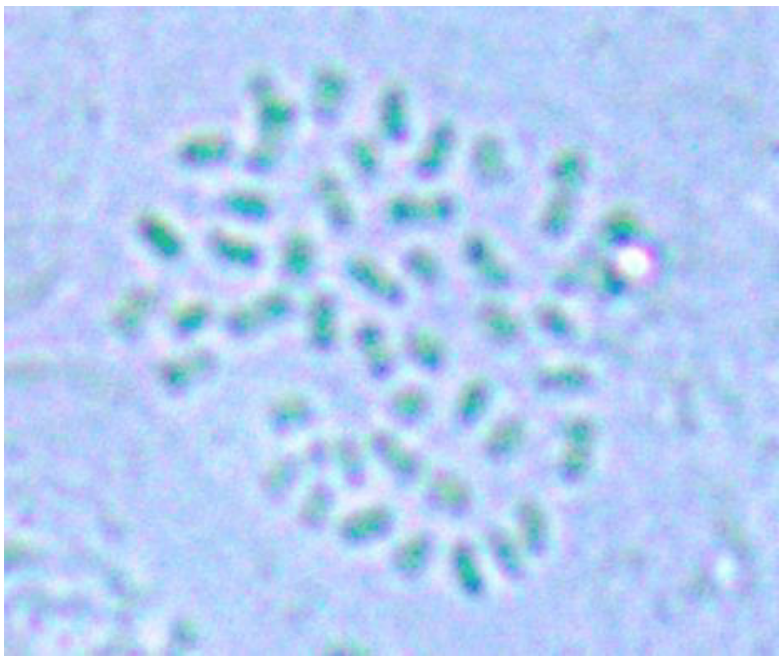

Figura 3. Lámina en Blanco. Campo cromosómico de aguaymanto visto en el microscopio óptico con el nivel mínimo de apertura del condensador.1000x.

6.2 Obtención de las sondas ADNr

6.2.1 Sonda para el locus ADNr 5s

- **Estandarización de las condiciones del ciclo de PCR**

Para la estandarización del proceso de amplificación del ADNr 5s, en primer lugar se evaluó la temperatura de Alineamiento en un rango de 48-62°C. Observándose que en cada una de las temperaturas probadas no había diferencia en el patrón de bandas (Figura 4). Por lo tanto, se optó por elegir la temperatura de 57,5°C debido a que este generaba una amplificación con más resolución en sus bandas. Además se observó que

el tamaño del amplicón menor era de aproximadamente 350pb, siendo este la unidad base de repetición de este locus ADNr 5s, y los de mayor tamaño se encontraban en un rango que era múltiplo al amplicón de menor tamaño. El segundo amplicón era el doble del tamaño al amplicón menor, aproximadamente 700pb, y el tercero era el triple de tamaño, amplicón mayor a 1000pb. Todo esto se encontraba dentro del patrón correcto de bandas producto de una PCR de una región que se repite en tándem.

En segundo lugar se evaluó el tiempo de extensión durante la PCR, con el fin de obtener con más definición las amplificaciones múltiples de la repetición base del locus ADNr 5s y así tener más cantidad de amplicones de mayor tamaño para el posterior marcado con Nick Translation. Se observó que a partir de los 45 segundos de tiempo de extensión en los ciclos de amplificación, se obtenía las bandas múltiples con una buena definición (Figura 4).

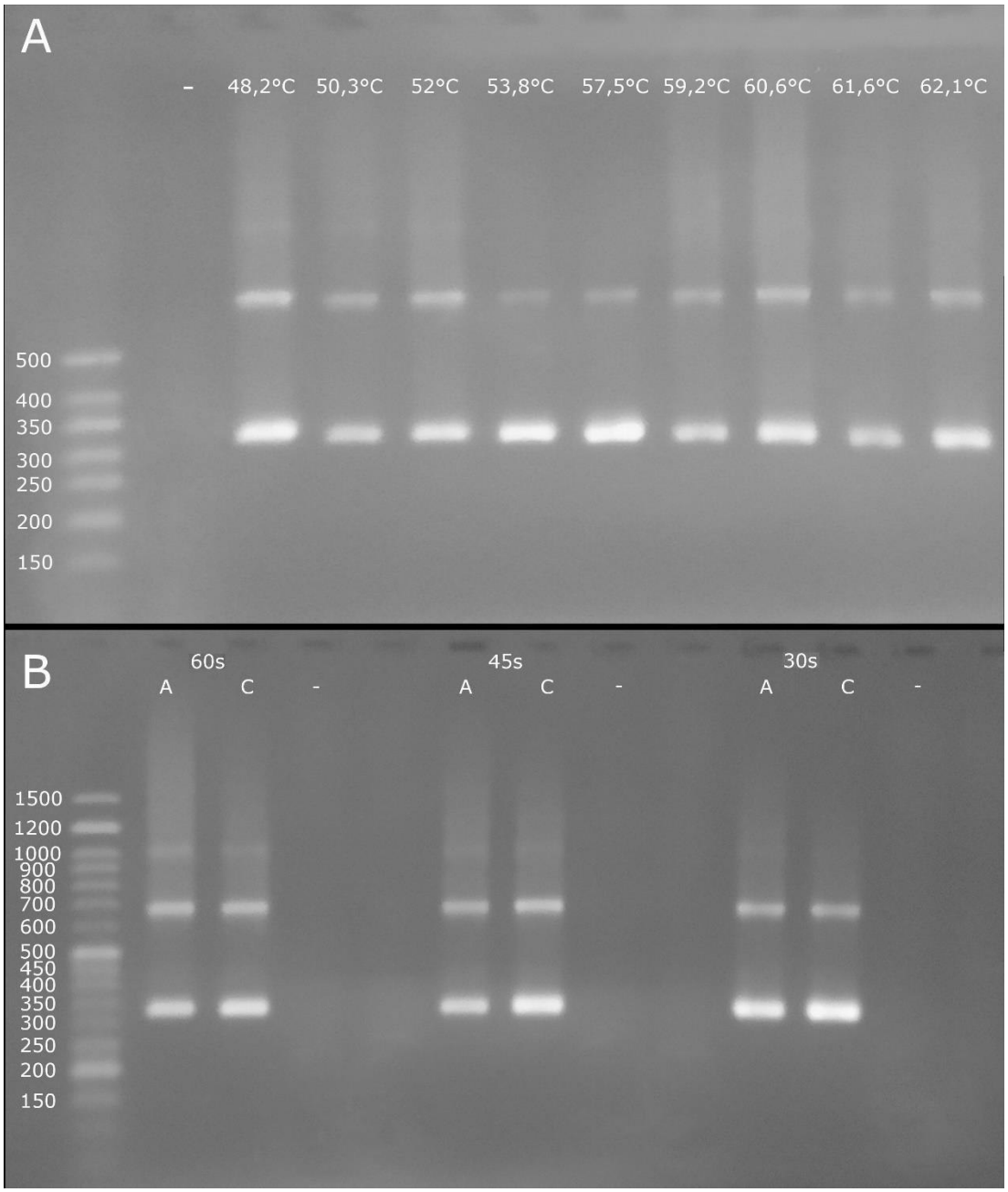

Figura 4. Electroforesis en agarosa al 2% de la estandarización de la T° de Alineamiento y el tiempo de extensión de la PCR del ADNr 5s. En **A** se observa el patrón de bandas correspondiente a la amplificación en gradiente del ADNr 5s con distintas temperaturas de Alineamiento. En **B** se observa el patrón de bandas de la amplificación del ADNr 5s con variaciones en el tiempo de extensión. El símbolo "– "corresponde al control negativo durante las amplificaciones y las letras A y C, corresponden a repeticiones.

Una vez definido las anteriores condiciones de T° de Alineamiento y tiempo de extensión, se resume en la siguiente tabla el ciclo estandarizado de la PCR:

Tabla 2. Condiciones del ciclo de PCR para la amplificación del ADNr 5s estandarizadas para el presente estudio.

Denaturación inicial	94°C	9 minutos	1 ciclo
Denaturación	95°C	30 segundos	45 ciclos
Alineamiento	57.5°C	30 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión Final	72°C	5 minutos	1 ciclo

- **Marcado del amplicón ADNr 5s con biotina**

Se siguió las especificaciones del fabricante del kit BioNick™ DNA Labeling System de Invitrogen™. Se empleó un tiempo de reacción de 90 minutos para el marcado por Nick Translation. Se obtuvieron fragmentos de entre 100pb y 50pb marcados con biotina, siendo estos la sonda para la detección del locus ADNr 5s (Figura 5). La sonda obtenida se utilizó posteriormente para el FISH para ubicar el locus ADNr 5s.

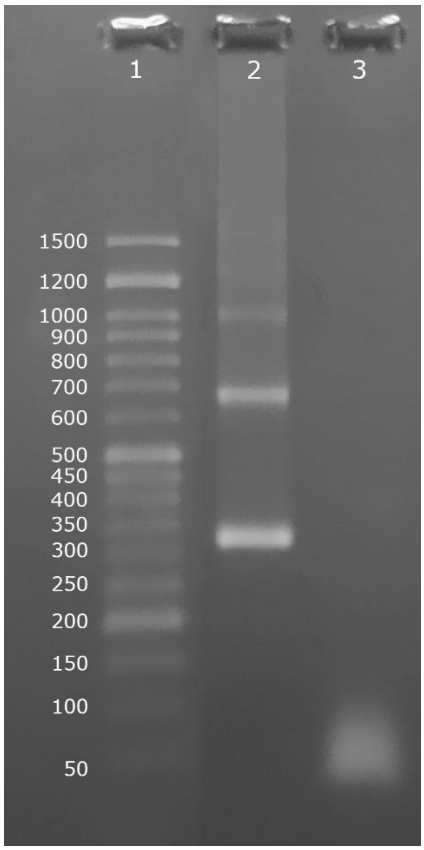

Figura 5. Electroforesis en agarosa al 2% antes y después del proceso de marcado con Nick Translation. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (pares de bases). En el carril 2 se observa los amplicones del ADNr 5s antes de someterse al proceso de Nick Translation. En el carril 3 se observan los fragmentos de ADN marcados con biotina generados después del proceso de Nick Translation

6.2.2 Sonda para el locus ADNr 45s

- **Estandarización de las condiciones del ciclo de PCR**

Se evaluó la temperatura de Alineamiento para la amplificación del gen 18s en un rango de temperaturas de 54°C a 62°C. Observándose que para la menor temperatura de 54°C se observan ligeras bandas inespecíficas de tamaño mayor a 1000pb y para las otras dos de 58°C y 62°C solo presentaba el amplicón de interés, sin embargo el de temperatura de 62°C presenta una banda más definida sin la ligera degradación por

encima de la banda que presenta la de 58°C (Figura 6). Debido a esto eligió la temperatura de Alineamiento de 62°C.

Además se observa que el tamaño del amplicón es de aproximadamente 650pb, lo cual se encuentra en el rango predicho por el autor del par de primers para la amplificación del gen 18s (Hadziavdic *et al*. 2014).

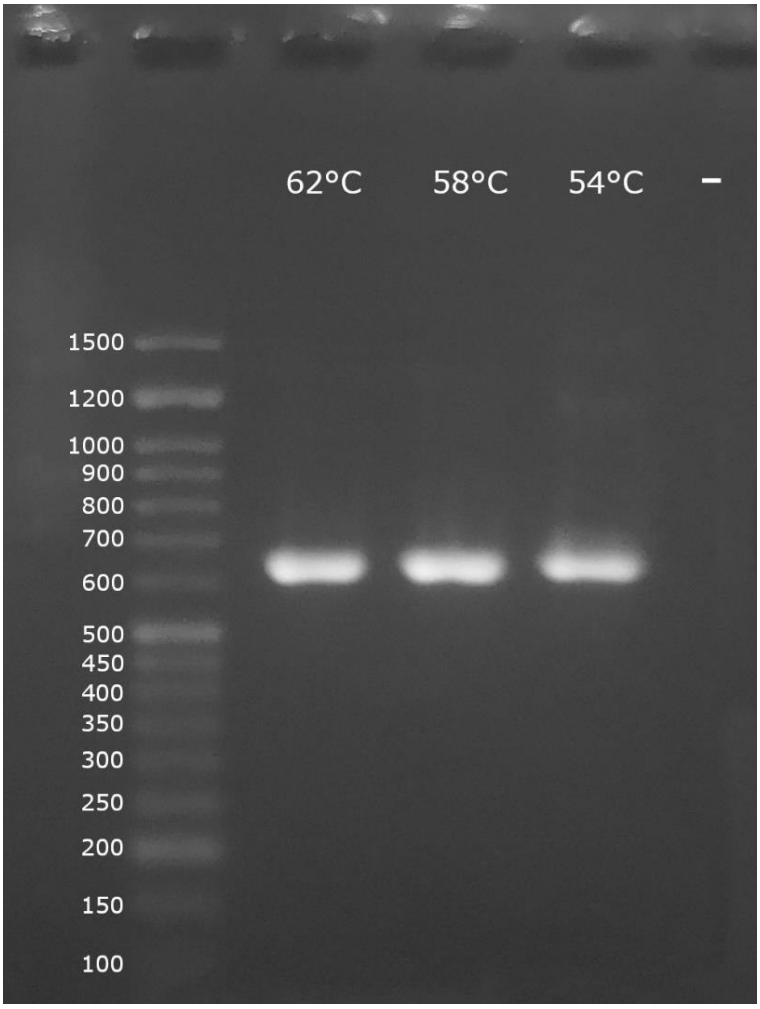

Figura 6. Electroforesis en agarosa al 2% de la estandarización de la T° de Alineamiento del gen 18s. Se observa un amplicón aproximado de 650pb y ligeras bandas inespecíficas en la temperatura de 54°C. El símbolo "–" corresponde al control negativo durante la amplificación en gradiente.

Una vez definido las anteriores condiciones de T° de Alineamiento, se resume en la siguiente tabla el ciclo estandarizado de PCR:

Tabla 3. Condiciones del ciclo de PCR para la amplificación del gen 18s estandarizadas para el presente estudio.

Denaturación inicial	94°C	9 minutos	1 ciclo
Denaturación	95°C	30 segundos	42
Alineamiento	62°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión Final	72°C	5 minutos	1 ciclo

- **Marcado del amplicón 18s con digoxigenina**

Se siguió las especificaciones del fabricante del kit DIG-Nick Translation Mix de ROCHE. Donde para determinar la longitud óptima de los fragmentos marcados por Nick Translation se estandarizó el tiempo de reacción entre 100 y 180 minutos, donde se obtuvo fragmentos de entre 50pb y 650pb aproximadamente marcados con digoxigenina (Figura 7). Se eligieron los resultados del tiempo de reacción de 180 minutos, porque presentaban una gradiente de fragmentos marcados de menor tamaño frente a los otros tiempos de reacción. Estos fragmentos marcados con digoxigenina serían la sonda para posteriormente utilizarlos en el FISH para ubicar el locus ADNr 45s.

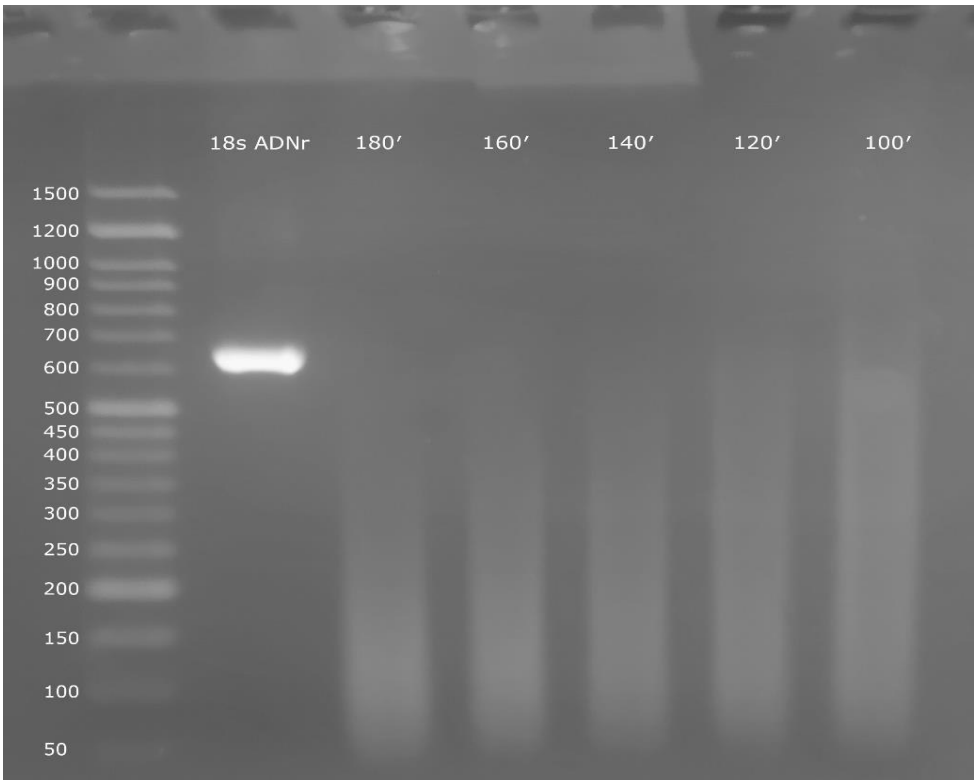

Figura 7. Electroforesis en agarosa al 2% de la estandarización del tiempo de reacción del Nick Translation para el marcado del amplicón 18s. Se observa una gradiente de amplicones aproximadamente de entre 50pb y 650pb entre los tiempos de reacción probados, lo cual disminuye con un mayor tiempo de reacción.

6.3 Hibridación Fluorescente in situ

6.3.1 Obtención y Procesamiento de Imágenes

Se obtuvo un total de 100 campos metafásicos, de los cuales 25 eran para cada una de las cuatro poblaciones en estudio, cada uno de estos campos presentaban los cromosomas disgregados y un número cromosómico de 48. Todas las fotos fueron tomadas a un mismo nivel de intensidad de luz y con su filtro correspondiente. Posteriormente mediante el software de edición de imágenes GIMP, las señales de ADNr fueron aisladas cada una para posteriormente superponerlos en la foto con la señal de DAPI (Figura 8). De los 25 campos de cada población, se eligió posteriormente a las 12 mejores para la caracterización de los cromosomas que presentaban hibridación de las sondas de ADNr.

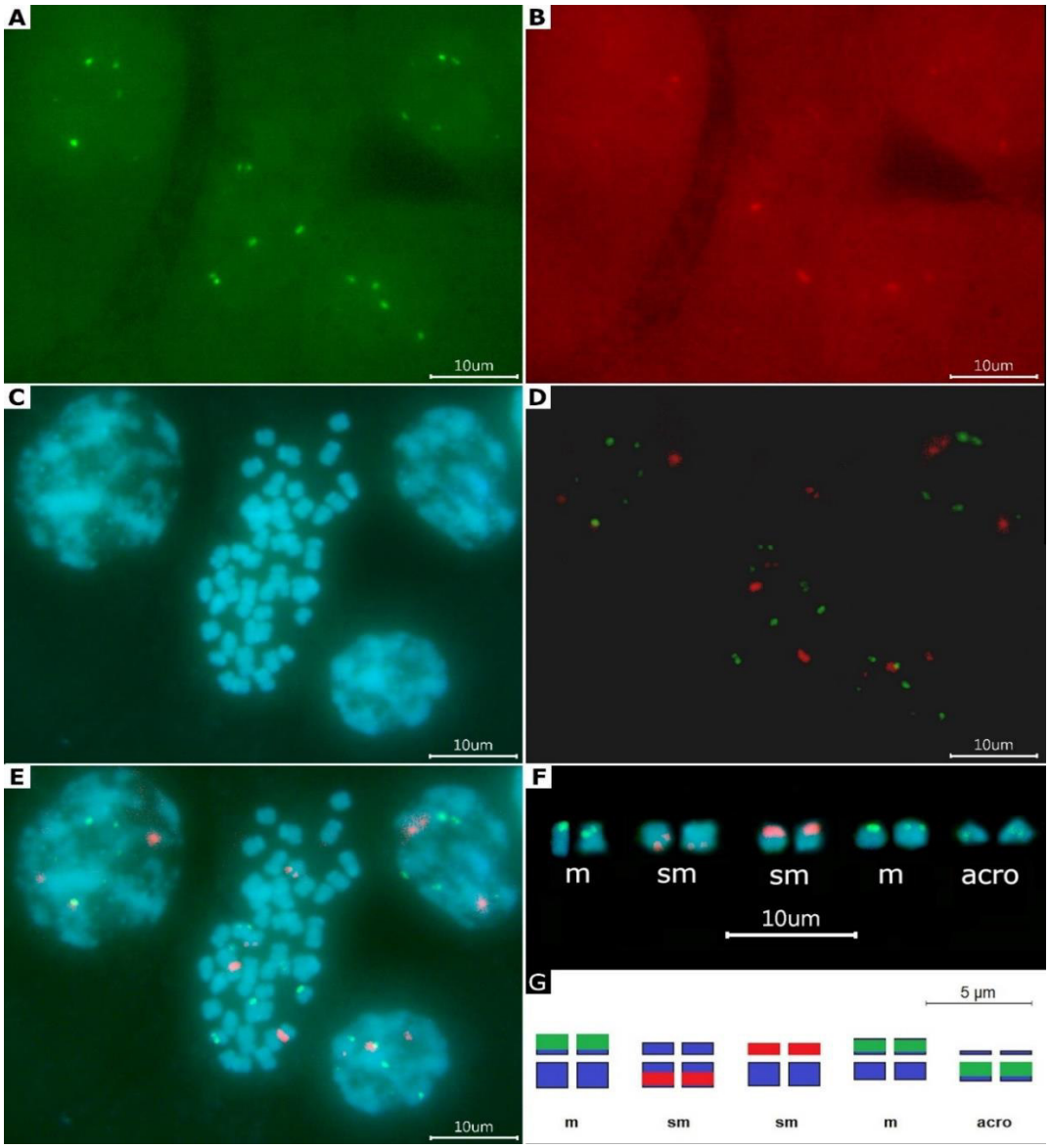

Figura 8. Fotografias de las señales de las sondas de ADNr y DAPI y su posterior superposición evidenciando hibridación en los cromosomas. En **A**: señales para ADNr 5s mediante Oregon Green 488 a través de los filtros de excitación BP 470/40 y emisión BP 540/50. En **B**: señales para el ADNr 45s mediante Rodamina mediante filtros de excitación BP 560/40 y emisión BP 630/75. En **C**: campo metafásico teñido con DAPI capturado con los filtros de excitación BP 340/30 y emisión BP 510/90. En **D**: señales de ADNr 5s y 45s superpuestas en una sola imagen. En **E**: campo metafásico superpuesta con la imagen de las señales de ADNr. En **F**: cromosomas que presentaban hibridación de manera ordenada y caracterizados morfológicamente. En **G**: ideograma de los cromosomas de F. m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, acro=acrocéntrico.

6.3.2 Número de sitios de ADNr

El número de sitios de ADNr se determinó evaluando los 25 campos metafásicos para cada población. Los sitios se contaron por cada cromosoma metafásico. Se encontró un total de 5 combinaciones de número de sitios de ADNr entre todas las poblaciones, donde la población de Ayacucho Cultivado presentó tres de estas combinaciones, la de Cajamarca Cultivado presentó cuatro, la población de Ayacucho Silvestre presentó tres y la de Cajamarca Silvestre presento también tres (Figura 9, 10 y 11). De estas, se observó una clara distinción del número de sitios entre las poblaciones silvestres y cultivadas. Se observa que el mayor porcentaje del número de sitios para las poblaciones silvestres de Ayacucho y Cajamarca fue de 6 sitios de ADNr 5s y 4 sitios de ADNr 45s, mientras que para las poblaciones cultivadas de Ayacucho y Cajamarca el mayor porcentaje fue de 6 sitios ADNr 5s y 2 sitios ADNr 45s (Figura 9).

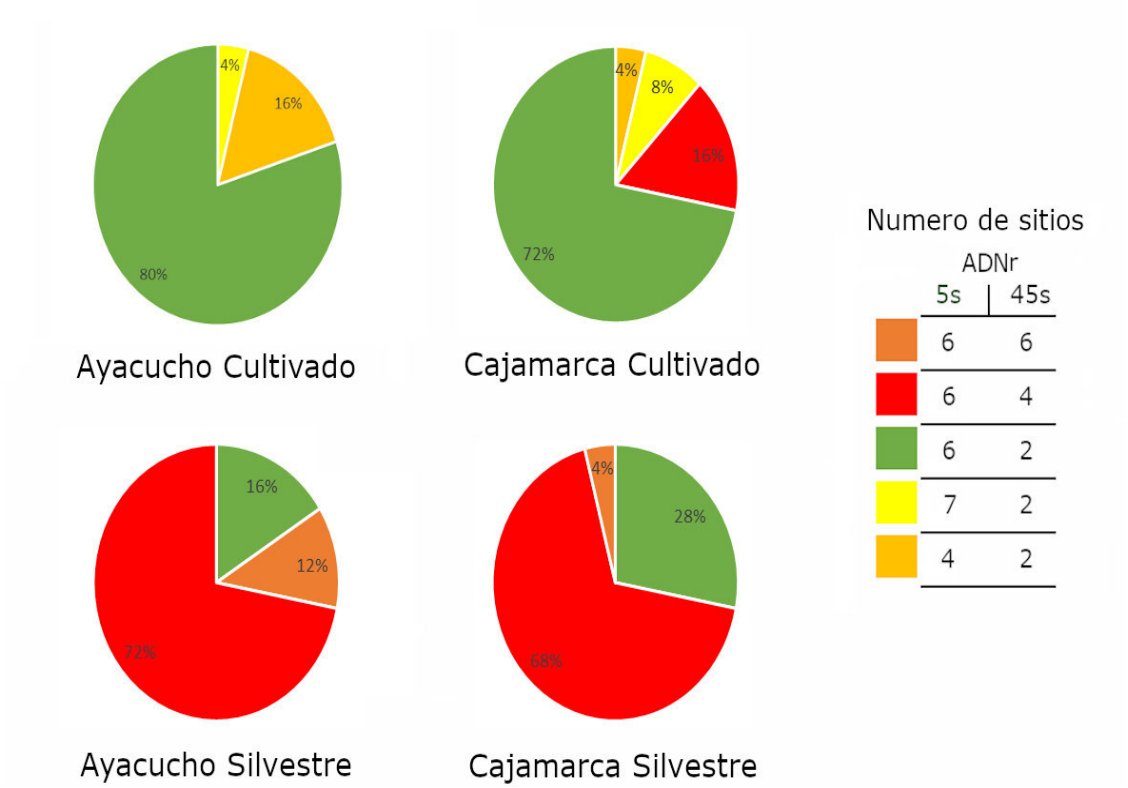

Figura 9. Porcentaje del número de sitios de ADNr de cada población.

Porcentualmente se observa que el número de sitios de ADNr 5s para todas las poblaciones se conserva en 6, mientras que el número de sitios de ADNr 45s se conserva en 2 para las poblaciones cultivadas y en 4 para las poblaciones silvestres. Además la población que presenta la mayor variación intrapoblacional con respecto al número de sitios de ADNr 5s y 45s es el de Cajamarca Cultivado (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje del número de sitios de ADNr por cada población. El * indica diferencia significativa entre grupos de pares mediante la prueba de X2:Chi-cuadrado

Población	n	Sitios	
		ADNr 5s	ADNr 45s
Ayacucho Cultivado	25	6 (80%), 4(16%) y 7(4%)	2 (100%)*
Cajamarca Cultivado		6(88%), 4(4%) y 7(8%)	2(84%) y 4(16%)*
Ayacucho Silvestre		6(100%)	4(72%), 2(16%) y 6(12%)
Cajamarca Silvestre		6(100%)	4(68%), 2(28%) y 6(4%)

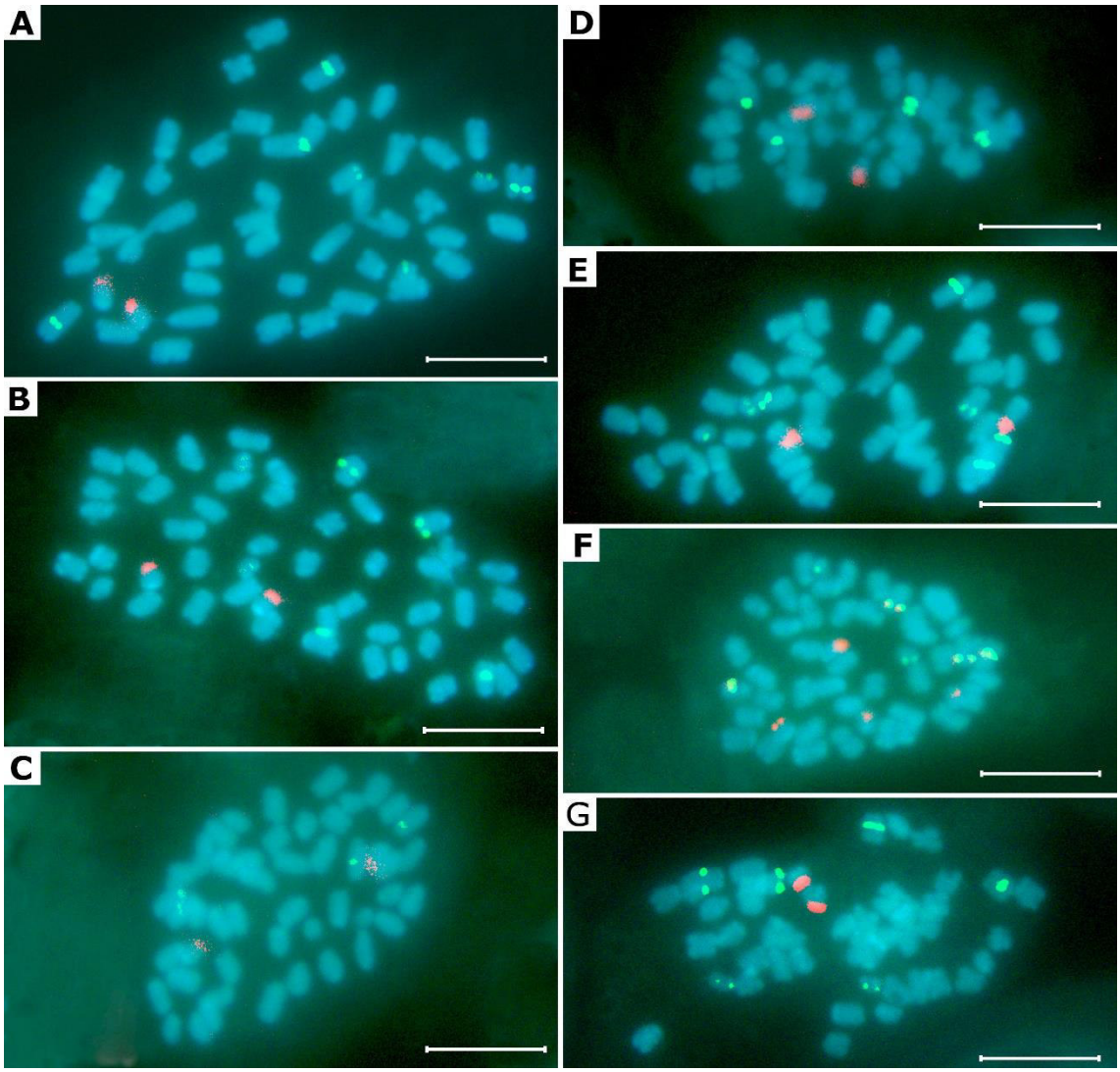

Figura 10. Imágenes del FISH de las poblaciones cultivadas con las señales fluorescentes del ADN ribosomal 5s (verde) y 45s (rojo). Las imágenes A, B y C pertenecen a la población de Ayacucho Cultivado de las tres combinaciones de número de sitios ADNr reportadas. En **A** se observa 7 sitios de ADNr 5s y 2 sitios ADNr 45s; en **B**, 6 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de 45s; y en **C**, 4 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de ADNr 45s. Las imágenes D, E, F y G pertenecen a la población de Cajamarca Cultivado de las cuatro combinaciones de numero de señales ribosomales reportadas. En **D** se observa 4 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de ADNr 45s; en **E**, 7 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de ADNr 45s; en **F**, 6 sitios de ADNr 5s y 4 sitios de ADNr 45s; y en **G**, 6 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de ADNr 45s. La barra de escala equivale a 10µm.

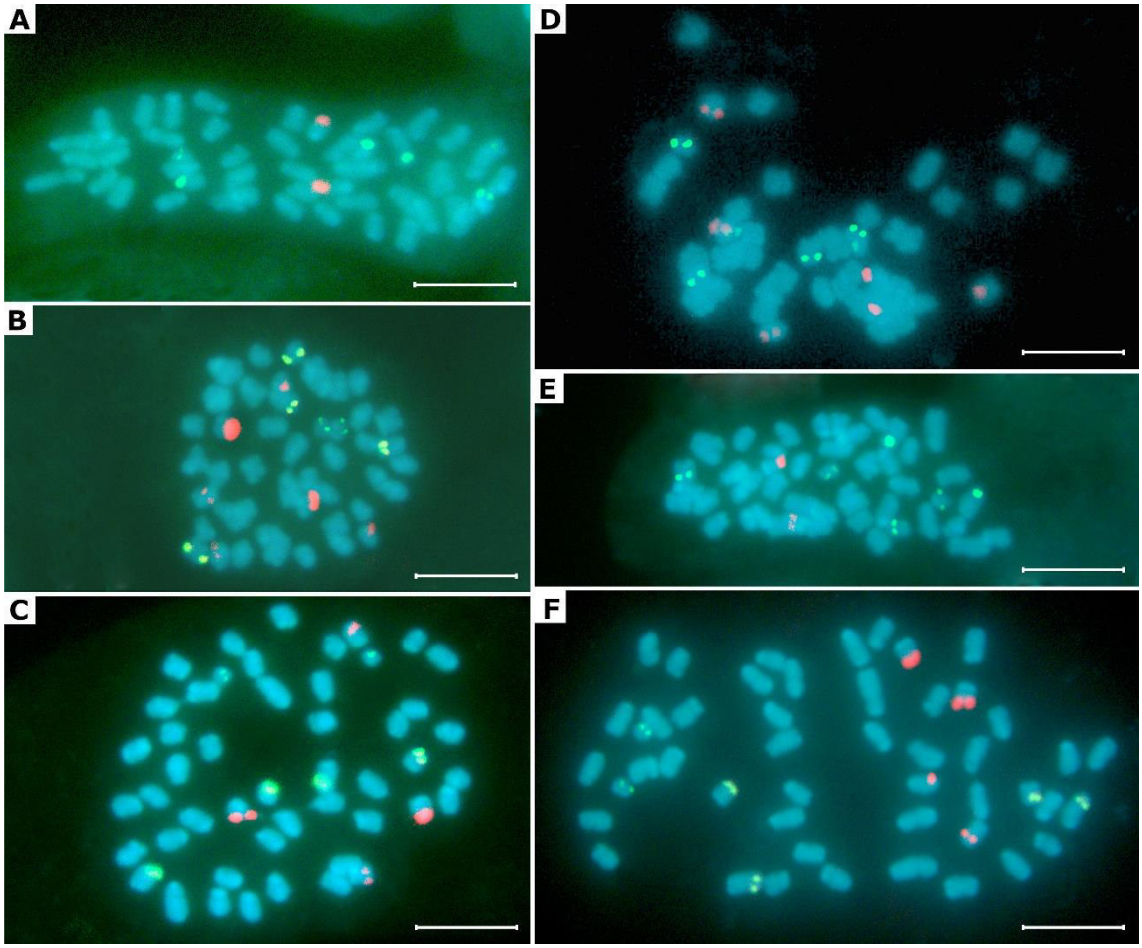

Figura 11. Imágenes del FISH de las poblaciones silvestres con las señales fluorescentes del ADN ribosomal 5s (verde) y 45s (rojo). Las imágenes A, B y C pertenecen a la población de Ayacucho Silvestre de las tres combinaciones de número de sitios de ADNr reportadas. En **A** se observa 6 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de ADNr 45s; en **B**, 6 sitios de ADNr 5s y 6 sitios de 45s; y en **C**, 6 sitios de ADNr 5s y 4 sitios de ADNr 45s. Las imágenes D, E y F pertenecen a la población de Cajamarca Silvestre de las tres combinaciones de número de sitios de ADNr reportadas. En **D** se observa 6 sitios de ADNr 5s y 6 sitios de ADNr 45s; en **E**, 6 sitios de ADNr 5s y 2 sitios de ADNr 45s; y en **F**, 6 sitios de ADNr 5s y 4 sitios de ADNr 45s. La barra de escala equivale a 10µm.

6.3.3 Caracterización de los cromosomas que presentan ADNr

Se analizó los 12 mejores campos metafásicos de cada población, considerando por lo menos un campo de cada combinación de número de sitios de ADNr. Además estos campos presentaban los cromosomas con las señales ADNr de manera que el reconocimiento de su centrómero y su señal ribosomal sea claramente distinguibles, permitiendo así su individualización, caracterización morfológica y apareamiento con su homólogo.

Para la población de Ayacucho Cultivado se analizó 2 campos metafásicos que presentaban 4 sitios 5s y 2 sitios 45s, 9 campos metafásicos que presentaban 6 sitios 5s y 2 sitios 45s y 1 campo metafásico que presentaba 7 sitios 5s y 2 sitios 45s. Para la población de Cajamarca Cultivado se analizó 1 campo metafásico que presentaban 4 sitios 5s y 2 sitios 45s, 8 campos metafásicos que presentaban 6 sitios 5s y 2 sitios 45s, 2 campos metafásicos que presentaba 6 sitios 5s y 4 sitios 45s y 1 campo metafásico que presentaba 7 sitios 5s y 2 sitios 45s (Figura 12).

Para la población de Ayacucho Silvestre se analizó 1 campo metafásico que presentaban 6 sitios 5s y 2 sitios 45s, 9 campos metafásicos que presentaban 6 sitios 5s y 4 sitios 45s y 2 campos metafásicos que presentaba 6 sitios 5s y 6 sitios 45s. Para la población de Cajamarca Silvestre se analizó 4 campos metafásicos que presentaban 6 sitios 5s y 2 sitios 45s, 7 campos metafásicos que presentaban 6 sitios 5s y 4 sitios 45s y 1 campo metafásico que presentaba 6 sitios 5s y 6 sitios 45s (Figura 13).

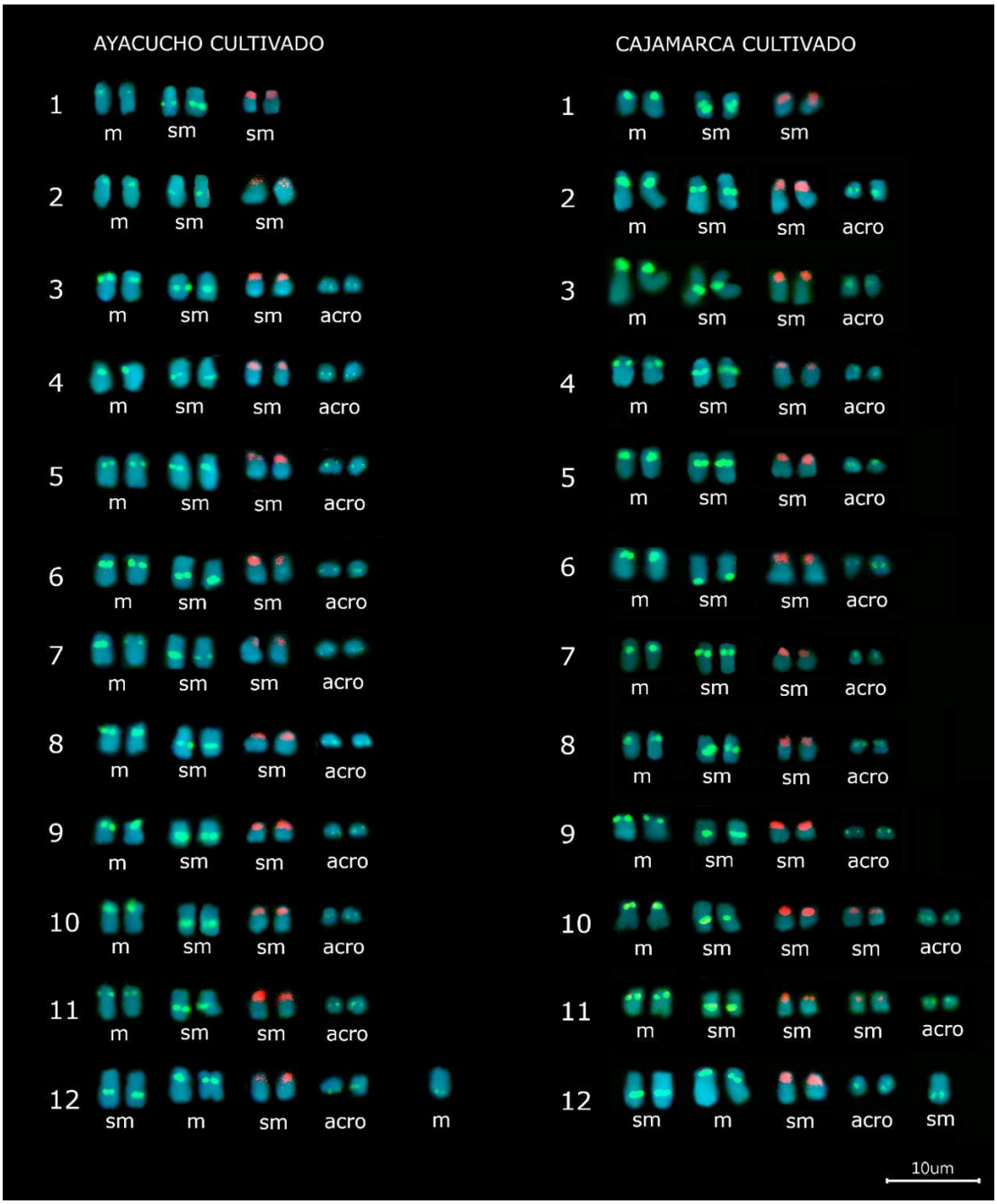

Figura 12. Cromosomas que presentaban señales de hibridación de ADNr de los 12 mejores campos metafásicos de las poblaciones cultivadas apareados con sus pares homólogos. m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, acro=acrocéntrico.

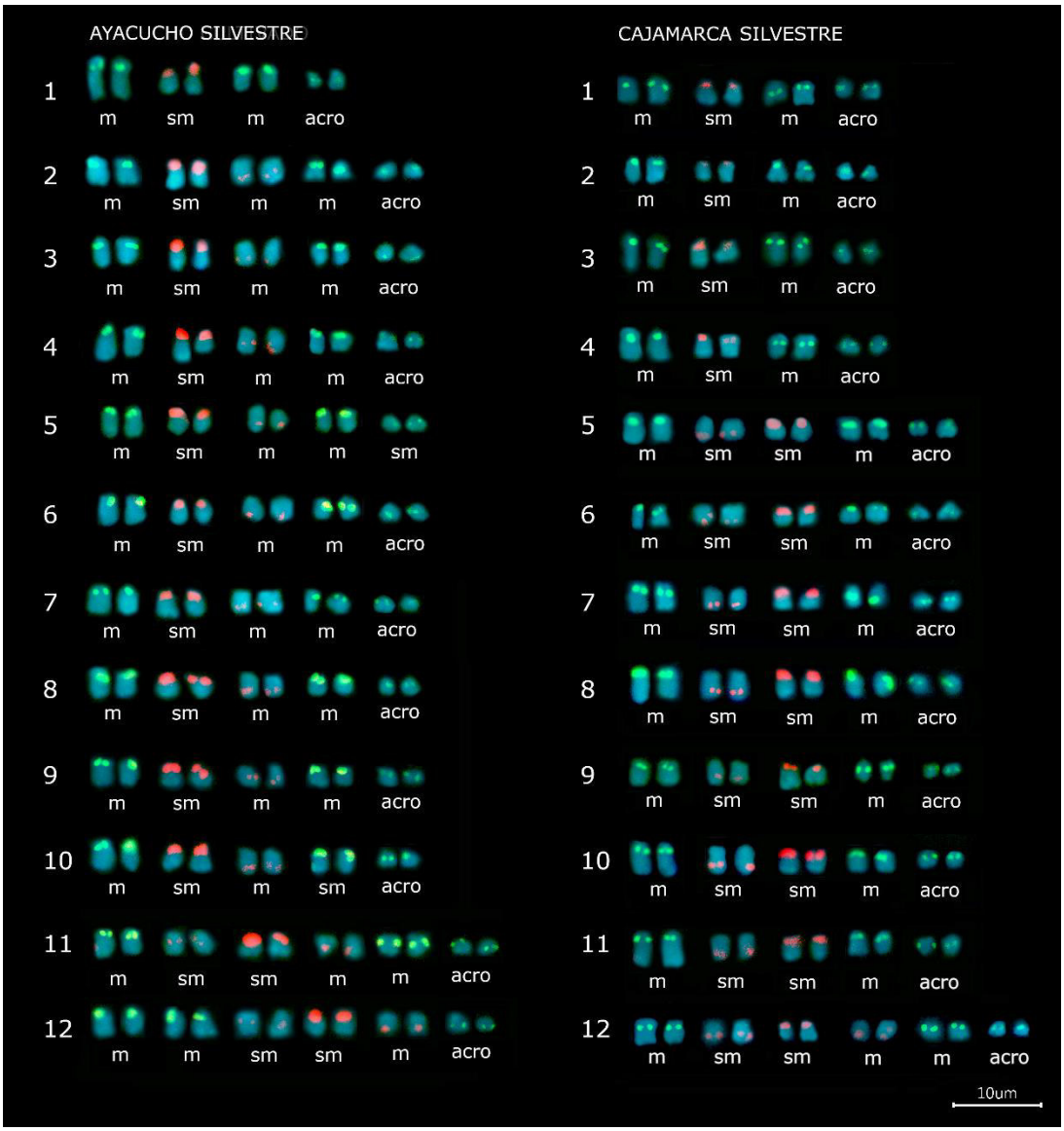

Figura 13. Cromosomas que presentaban señales de hibridación de ADNr de los 12 mejores campos metafásicos de las poblaciones silvestres apareados con sus pares homólogos. m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, acro=acrocéntrico.

Del análisis de los cromosomas con hibridación de ADNr en las poblaciones estudiadas, se encontró 9 tipos de cromosomas hibridados de acuerdo a su morfología, tipo de señal ribosomal, posición de la señal ribosomal en el cromosoma y presencia en las poblaciones (Figura 14 y Tabla 5). Estos fueron nombrados de acuerdo a su conservación poblacional. Los cromosomas denominados *N*, por núcleo, son los que

están presentes en todas las poblaciones: *N1* presenta una morfología metacéntrica y una señal ribosomal 5s en el brazo p, *N2* con una morfología submetacéntrica y una señal ribosomal 45s en el brazo p y el *N3* con morfología acrocéntrica y una señal ribosomal 5s en el brazo p. Los cromosomas denominados *S*, por silvestre, son los que están presentes solo en las poblaciones silvestres: *S1* presenta una morfología submetacéntrica y una señal ribosomal 45s en el brazo q, el *S2* con una morfología metacéntrica y una señal ribosomal 5s en el brazo q y el *S3* con una morfología metacéntrica y una señal ribosomal 5s en el brazo p. Los cromosomas denominados *C*, por cultivado, son los que están presentes solo en las poblaciones cultivadas: *C1* presenta una morfología submetacéntrica y una señal ribosomal 5s en el brazo q y el *C2* presenta una morfología entre metacéntrico/submetacéntrico con una señal ribosomal 5s en el brazo q. El cromosoma denominado *CC*, por solo estar presente en la población de Cajamarca Cultivado, presenta una morfología submetacéntrica y una señal ribosomal 45s en el brazo p. Cabe aclarar que si bien el *N1* y el *S3* se describen de la misma forma, este último presenta un tamaño mucho menor, esto también ocurre con los cromosomas *N2* y *CC*. Por otro lado en el caso de *C1* y *C2*, la diferencia radica principalmente en la posición de la señal ribosomal 5s, donde la señal en el *C1* se encuentra cerca al centrómero y en el *C2* se encuentra cerca al telómero (Figura 14).

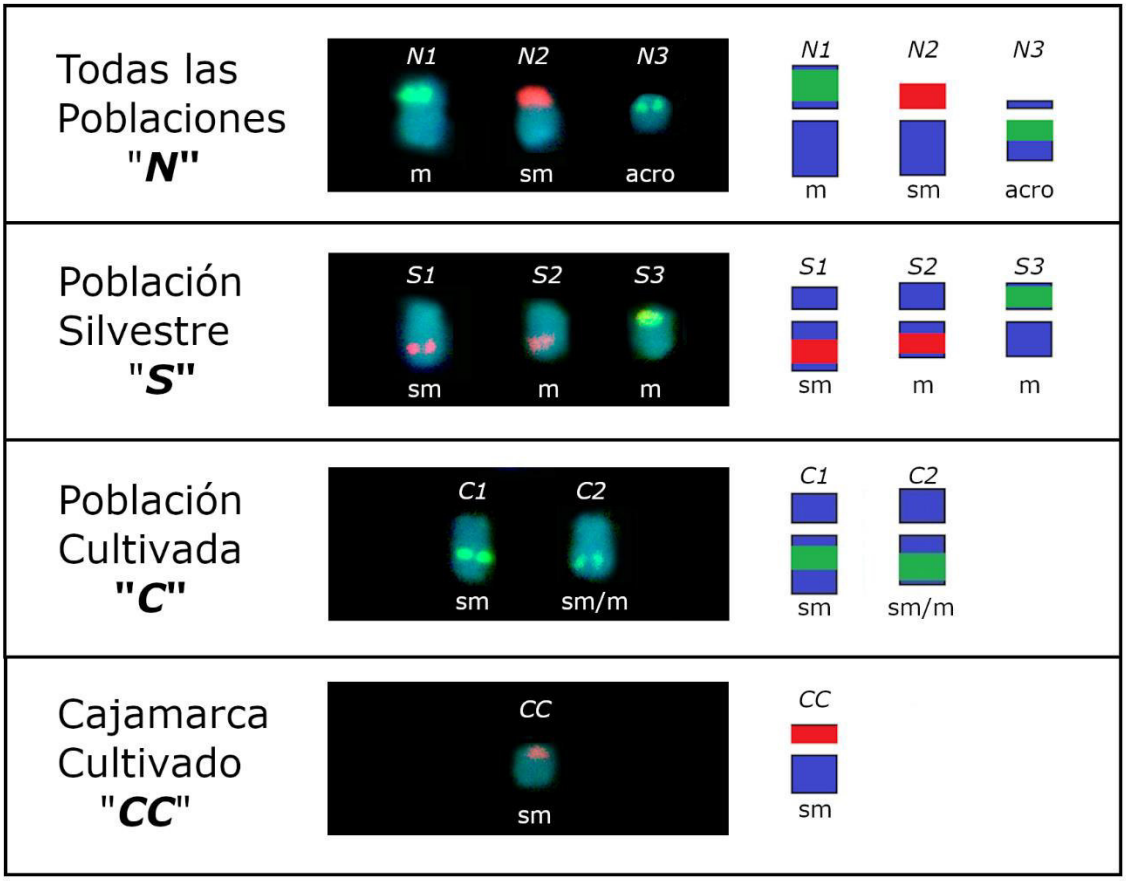

Figura 14. Tipos de cromosomas que presentaban hibridación de la sonda de ADNr. Caracterización morfológica de los 9 tipos de cromosomas con hibridación reportados y clasificados de acuerdo a su conservación en las poblaciones. En la figura se observa la foto e ideograma referencial de los 9 tipos de cromosomas. m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, acro=acrocéntrico

Los tipos de cromosomas con hibridación por cada población se muestran en la Figura 15. Donde se observó que en las dos poblaciones silvestres se encontraban 6 de los 9 tipos de cromosomas hibridados encontrados: *N1*, *N2*, *N3*, *S1*, *S2* y *S3*. Además se evidenció que el tamaño relativo entre los cromosomas *S2* y el *S3* variaba entre las poblaciones silvestres, siendo en la de Ayacucho el S2 mayor al S3 y en la de Cajamarca de manera inversa. También se observa una ligera diferencia en la posición de la señal ribosomal 45s entre los cromosomas *S1* de ambas poblaciones, siendo en la de

Ayacucho de posición centromérica y en la de Cajamarca de posición intersticial. Cabe destacar que también hay una diferencia en el porcentaje de cromosomas hibridados observados en los campos metafásicos entre ambas poblaciones silvestres, tales como en los cromosomas *S1*, donde en la población de Ayacucho está presente en solo un 16.6% y en la población de Cajamarca está en 66.6%; también se observa esta diferencia porcentual en el cromosoma *S2*, donde en la población de Ayacucho está presente en 91,6% y en la población de Cajamarca solo en un 8.3%. Con respecto a las poblaciones cultivadas, se observó que Ayacucho presentaba 5 de los 9 tipos de cromosomas hibridados: *N1, N2, N3, C1 y C2*; y que Cajamarca presentaba 6 de los 9 tipos: *N1, N2, N3, C1, C2, y CC*. Entre ambas poblaciones cultivadas se observó que el cromosoma *N3* varió en cuanto al porcentaje en los campo metafásicos observados, en Ayacucho presentaba un 83.3% y en Cajamarca un 91.6%. También se observa la variación de morfología presente para el tipo de cromosoma *C2*, para la población de Ayacucho, este cromosoma presenta una morfología metacéntrica y para la población de Cajamarca, una morfología submetacéntrica.

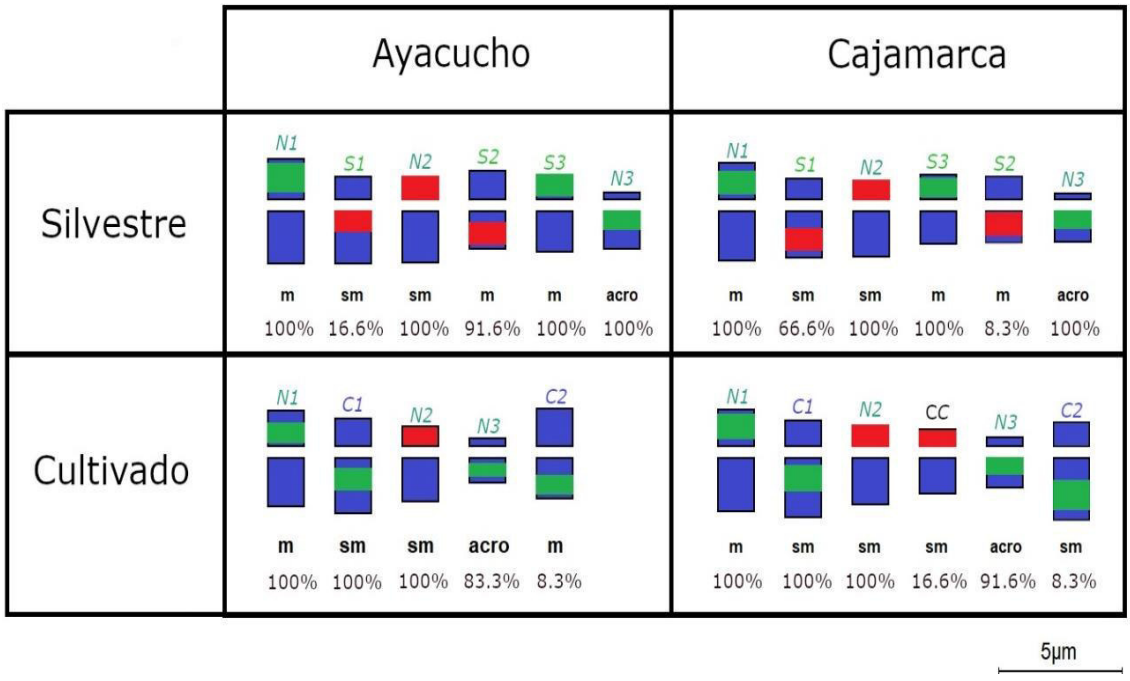

Figura 15. Tipos de cromosomas que presentaban hibridación de la sonda de ADNr por cada población. Se observa el ideograma realizado con el promedio de las mediciones morfológicas de los tipos de cromosomas con hibridación de cada población En la parte inferior de cada cromosoma está presente el porcentaje observado del total de campos metafásicos para cada población que presenta ese tipo de cromosoma. m=metacéntrico, sm=submetacéntrico, acro=acrocéntrico.

6.3.4 Comparación de los tipos de cromosomas con señales ADNr

Se determinaron los datos morfométricos promedio de todos los tipos de cromosomas que presentaban hibridación en las poblaciones analizadas en base a las mediciones obtenidas en ideokar, además de realizar una cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las señales ADNr de cada cromosoma cuantificado en imageJ (Tabla 5). Solo hubo una medición para el cromosoma *S2* de Cajamarca silvestre y para los cromosomas de *C2* de las poblaciones cultivadas.

Para las comparaciones estadísticas entre las poblaciones en función de los datos de los cromosomas que presentaban hibridación, solo se trabajaron con los datos de los cromosomas de tipo *N1, N2, N3, S3, y C1* por tener datos suficientes para las pruebas

estadísticas. Estas características no fueron cumplidas por los datos de los cromosomas *S1, S2 y C2,* debido a que solo habían datos de un solo campo metafásico en algunas poblaciones que presentaban estos cromosomas como el *S2*, en la población de Cajamarca Silvestre; y el *C2*, en ambas poblaciones cultivadas; caso similar ocurría con los datos del cromosoma *S1* en la población Ayacucho silvestre donde solo habían 2 datos (Tabla 7). Estas características no permitieron realizar las inferencias estadísticas entre los grupos que presentaban estos tipos de cromosomas.

Tabla 5. Datos morfométricos de los 9 tipos de cromosomas que presentaban hibridación y su cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las señales ADNr.

Población		Cromosomas portadores de ADNr conservados														
		N1					N2					N3				
		LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr	LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr	LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr
Cultivado	Ayacucho	2.997±0.218	1.448±0.129	3.82±0.331			2.339±0.265	2.054±0.208	3.721±0.303			1.321±0.144	3.396±0.452	2.946±0.188		
	Cajamarca	3.158±0.559	1.356±0.195	3.962±0.200			2.389±0.406	2.205±0.247	3.772±0.307			1.517±0.252	3.578±0.383	2.991±0.272		
Silvestre	Ayacucho	3.268±0.362	1.306±0.116	4.050±0.150	m	5s ->p	2.702±0.238	2.187±0.226	4.274±0.128	sm	45s ->p	1.676±0.174	4.446±0.628	3.228±0.168	acro	5s->q
	Cajamarca	3.055±0.451	1.343±0.175	3.938±0.310			2.324±0.272	2.319±0.325	3.869±0.537			1.454±0.203	4.141±0.479	3.118±0.450		
	Promedio	3.120±0.416	1.363±0.161	3.943±0.264			2.439±0.332	2.191±0.265	3.909±0.404			1.499±0.230	3.919±0.641	3.078±0.307		
		Cromosomas portadores de ADNr conservados en las poblaciones silvestre														
		S1					S2					S3				
		LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr	LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr	LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr
Silvestre	Ayacucho	2.726±0.018	2.270±0.485	2.981±0.144			2.451±0.188	1.479±0.114	3.366±0.171			2.362±0.243	1.302±0.161	4.107±0.146		
	Cajamarca	2.464±0.366	2.169±0.194	3.483±0.264	sm	45s ->q	2.035	1.379	3.427	m	45s ->q	2.120±0.286	1.266±0.178	3.882±0.404	m	5s ->p
	Promedio	2.516±0.341	2.189±0.240	3.383±0.318			2.417±0.216	1.471±0.122	3.371±0.164			2.241±0.287	1.284±0.167	3.995±0.319		
		Cromosomas portadores de ADNr conservados en las poblaciones cultivadas														
		C1					C2									
		LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr	LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr					
Cultivado	Ayacucho	2.971±0.342	2.092±0.251	3.881±0.304			2.833	1.075	3.179	m						
	Cajamarca	3.034±0.571	2.348±0.281	3.980±0.152	sm	5s ->q	2.983	2.826	3.180	sm	5s ->q					
	Promedio	3.002±0.461	2.220±0.292	3.930±0.240			2.908±0.106	1.951±1.238	3.180±0.001	m/sm						
		Cromosoma portador de ADNr														
		CC														
		LT	IB	LF	MC	Ubicación ADNr										
Cajamarca	Cultivado	1.922±0.047	2.027±0.366	3.212±0.062	sm	45s->p										

Los valores son expresados como promedio ± desviación estándar. LT = Longitud total del cromosoma; IB = Índice braquial o "arm ratio"; LF = Logaritmo de la fluorescencia de la señal ribosomal; MC = Morfología cromosómica; m = Metacéntrico; sm = Submetacéntrico; acro = Acrocéntrico.

Con el fin de realizar las comparaciones entre las poblaciones mediante los tipos de cromosomas *N1, N2, N3, S3, y C1*, en primer lugar se realizó la prueba de Shapiro-Wilk a los datos morfométricos (longitud del cromosoma e índice braquial) y de intensidad de fluorescencia para determinar si estos presentaban distribución normal y así poder elegir la prueba estadística paramétrica o no paramétrica correspondiente (Tabla 6). Se encontró que los datos del índice braquial para el cromosoma *N3* en las poblaciones de Ayacucho Cultivado y Ayacucho Silvestre eran los únicos que no presentaban distribución normal, por esta razón para estos datos se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Las pruebas de comparación estadística para estos cromosomas se muestran en la Tabla 6 y su visualización gráfica en la Figura 16. En el cual se evidenció que para el cromosoma *N1* no había diferencias entre todas las poblaciones a nivel de longitud del cromosoma, índice braquial y fluorescencia, siendo este el único cromosoma del tipo *N* con estos resultados. Para el cromosoma *N2* solo los datos de índice braquial no presentaban diferencias entre las poblaciones, mientras que si había para los datos de longitud del cromosoma y fluorescencia, siendo los datos de Ayacucho Silvestre los más diferentes entre todas las poblaciones. Con respecto al *N3* los datos de longitud de cromosoma e índice braquial no se conservaban entre todas las poblaciones, siendo las poblaciones de Ayacucho Cultivado y Ayacucho Silvestre las que más difieren con las otras poblaciones, solamente los datos de fluorescencia se mantuvieron sin variación para todas las poblaciones que presentaban este tipo de cromosoma. Para el cromosoma *S3* solo los datos de longitud del cromosoma mostraron diferencia entre las dos poblaciones, mientras que los datos de índice braquial y fluorescencia no mostraron diferencias entre ambas poblaciones. Y para el cromosoma *C1* ambas poblaciones no mostraron diferencia en cuanto a los datos de longitud del cromosoma y fluorescencia, pero sí se encontró diferencia significativa para los datos de índice braquial.

Tabla 6. Resultados de las pruebas estadísticas de normalidad y de comparación de grupos de los datos morfométricos y de fluorescencia entre los cromosomas que presentaban hibridación entre las poblaciones. Solo se muestran los tipos de cromosomas que presentaban datos suficientes para estas pruebas estadísticas.

Tipo de Cromosoma con Hibridación	Población	n	Longitud del Cromosoma		Índice Braquial		Log(Fluorescencia)	
			Shapiro-Wilk	Estadístico	Shapiro-Wilk	Estadístico	Shapiro-Wilk	Estadístico
N1	Ayacucho Cultivado	12	0.317	ANOVA F=0.983 p-value=0.409	0.821	ANOVA F=0.179 p-value=0.163	0.159	ANOVA F=1.603 p-value=0.202
	Cajamarca Cultivado	12	0.054		0.308		0.645	
	Ayacucho Silvestre	12	0.291		0.450		0.838	
	Cajamarca Silvestre	12	0.244		0.624		0.561	
N2	Ayacucho Cultivado	12	0.053	ANOVA F=4.160 p-value=**0.011** Tukey HSD: AS≠AC, AS≠CS	0.594	F=2.324 p-value=0.088	0.089	ANOVA F=6.165 p-value=**0.001** Tukey HSD: AS≠AC, AS≠CC, AS≠CS
	Cajamarca Cultivado	12	0.547		0.360		0.073	
	Ayacucho Silvestre	12	0.131		0.066		0.954	
	Cajamarca Silvestre	12	0.844		0.453		0.233	
N3	Ayacucho Cultivado	10	0.737	ANOVA F=6.103 p-value=**0.002** Tukey HSD: AC≠AS	**0.014**	Kruskal-Wallis H=22.0422 p-value = **0.00001**	0.794	ANOVA F=2.075 p-value=0.118
	Cajamarca Cultivado	11	0.545		0.532		0.642	
	Ayacucho Silvestre	12	0.805		0.923		0.839	
	Cajamarca Silvestre	12	0.621		**0.013**		0.966	
S3	Ayacucho Silvestre	12	0.967	t de Student t=2.226 p-value=**0.037**	0.283	t de Student t=0.507 p-value=0.617	0.983	t de Student t=1.762 p-value=0.092
	Cajamarca Silvestre	12	0.897		0.123		0.080	
C1	Ayacucho Cultivado	12	0.230	t de Student t=0.292 p-value=0.748	0.493	t de Student t=2.355 p-value=**0.028**	0.052	t de Student t=0.995 p-value=0.330
	Cajamarca Cultivado	12	0.120		0.425		0.503	

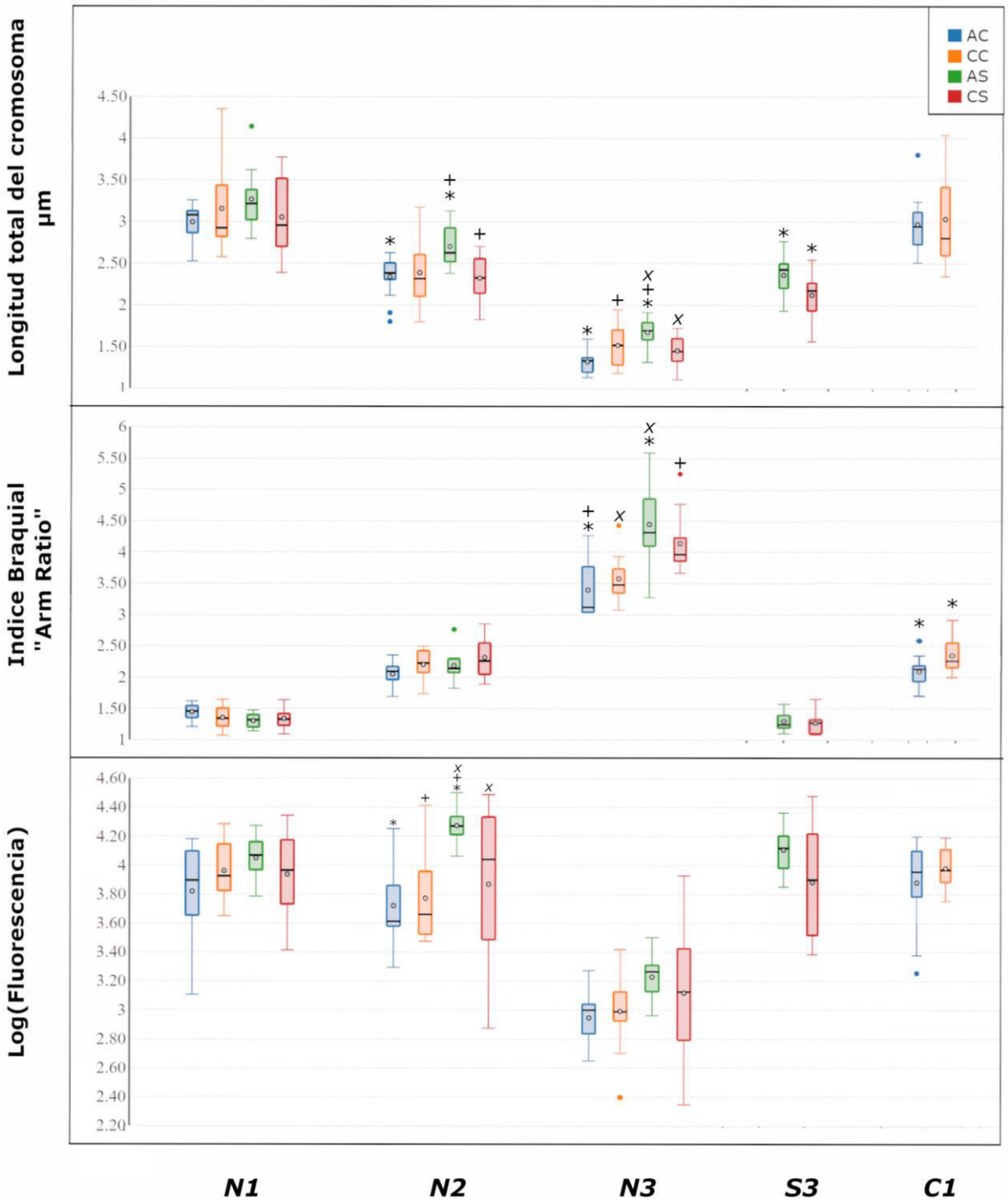

Figura 16. Gráfico de cajas de los datos morfométricos y de fluorescencia de los tipos de cromosomas analizados estadísticamente. Los símbolos que se muestran encima de ciertas cajas significan diferencia significativa para aquellas que presenten el mismo símbolo. Cada color representa a una población. AC = Ayacucho Cultivado, CC = Cajamarca Cultivado, AS = Ayacucho Silvestre, CS = Cajamarca Silvestre

A pesar de que los datos de los cromosomas S1, S2 y C2 no son posibles analizarlos con pruebas estadísticas, se puede mencionar de acuerdo a sus valores promedio y una diferencia aproximada de 0.5, que los datos del cromosoma S1 para la fluorescencia son distintos entre ambas poblaciones, también se observa esta diferencia para los valores de longitud del cromosoma en las poblaciones que presentan el cromosoma S2 y para el índice braquial en las poblaciones que presentan el cromosoma C2 (Tabla 7).

Tabla 7. Valores promedio de los datos morfológicos y fluorescencia de los tipos de cromosomas que no presentaban datos suficientes para las pruebas estadísticas.

Tipo de Cromosoma con Hibridación	Población	n	Longitud del Cromosoma	Índice Braquial	Log(Fluorescencia)
S1	Ayacucho Silvestre	2	2.726 ± 0.018	2.270 ± 0.485	2.981 ± 0.144
	Cajamarca Silvestre	8	2.464 ± 0.366	2.169 ± 0.194	3.483 ± 0.264
S2	Ayacucho Silvestre	11	2.451 ± 0.188	1.479 ± 0.114	3.366 ± 0.171
	Cajamarca Silvestre	1	2.035	1.379	3.427
C2	Ayacucho Cultivado	1	2.833	1.075	3.179
	Cajamarca Cultivado	1	2.983	2.826	3.180

7. DISCUSIÓN

7.1. Láminas en blanco y marcado de las sondas ADNr

La obtención de campos metafásicos con cromosomas disgregados es un requisito previo para el éxito en los análisis mediante FISH. En plantas la principal dificultad es la rigidez de la pared celular y la disgregación de los cromosomas, siendo lo último más complicado si la especie presenta un número cromosómico alto. Las poblaciones de aguaymanto analizadas presentaban cromosomas pequeños y un número de cromosomas de 48, lo cual en cuestión dificultaría la obtención de láminas en blanco. Ante esto se utilizó solo un aproximado del 10% de la concentración de colchicina utilizado en el protocolo de prefijación de Carbajal (2018), esto debido a que una concentración elevada de colchicina aumenta la condensación de los cromosomas y dificulta su análisis morfológico, especialmente en cromosomas pequeños (Koyani y Saiyad, 2011). Posteriormente para la eliminación de la pared celular, el uso de enzimas reportadas en el protocolo Aguilera (2016) y los procesos de lavado de Aliyeva et al. (2015), permitieron mediante la técnica de squash, obtener células correctamente disgregadas en la lámina y facilitar la visualización de las células en metafase (Figura 3).

En la estructura del ADNr 5s, el gen 5s es muy conservado en plantas con una longitud de aproximadamente 120pb y una región espaciadora variable dependiendo de la especie, teniendo longitudes entre 100-700pb (Sastri et al., 1992). En la Figura 4 se observa que para el aguaymanto la unidad ADNr 5s tiene una longitud aproximada de 350pb, lo cual haría que presente una estructura de ADNr con el gen 5s de tamaño de 120pb y una región espaciadora de una longitud aproximada de 230pb, este último se encontraría dentro del rango reportado para varias especies de la familia Solanaceae (Volkov et al. 2001). Por otro lado las bandas de mayor tamaño observados en la Figura 4, correspondería a los múltiplos de la unidad estructural del 5s ADNr debido a que es el producto de una amplificación de una región que se repite en tándem, este tipo de

patrones de amplificación del ADNr 5s ya se ha reportado en varios estudios con otras especies de plantas (Singh y Singh, 2001; Mizuochi et al., 2007; Alexandrov y Karlov, 2021). Este patrón se explica durante la amplificación, cuando un primer forward o reverse se empalman con el producto de otro primer forward o reverse de la siguiente repetición abarcando dos unidades ADNr 5s y así sucesivamente. En la Figura 4 solo se observa 3 bandas, debido al tiempo de extensión programado en el ciclo de PCR lo cual limita que aparezcan múltiplos de mayor tamaño. Esto no ocurre cuando se amplifica la región 18s, debido a que la estructura de la unidad de ADNr 45s es de un tamaño aproximado de 11Kbp, haciendo imposible el empalmado de forward y reverse entre distintas unidades contiguas con una PCR convencional (Waminal et al., 2018). Debido a esto, el producto de los primers diseñados para amplificar la región del gen 18s solo presenta una banda de aproximadamente 650pb (Figura 6), lo cual se encuentra dentro del rango 530-700bp reportado por los autores que diseñaron el primer (Hadziavdic et al., 2014).

El marcado de los amplicones mediante la técnica del Nick Translation permitió tener fragmentos marcados de entre 100pb y 50pb para el ADNr 5s y de 650 y 50 pb para el 18s (Figura 5 y 7). Esta diferencia se debe a la distinta eficiencia entre la actividad de la polimerasa y nucleasas que tienen los kits usados, siendo el parámetro más crítico la actividad de la DNAsa I. Las longitudes de las sondas se encuentran dentro del rango para mantener una adecuada especificidad hacia la región diana y para una correcta penetración hasta los cromosomas, tal como lo plantean Watters et al. (2002).

7.2 Número de sitios ADNr 5s y 45s

El número de señales ADNr aporta información para establecer las relaciones citotaxonómicas entre distintas especies de plantas, además de su caracterización. De acuerdo a la base de datos de Plant rDNA Database (https://www.plantrdnadatabase.com), la familia solanaceae presenta 195 especies descritas citomolecularmente, de los cuales 176 presentan información para el ADNr 5s

donde el 85% presenta 2 sitios de ADNr 5s, el 14% presenta 4 sitios y solo el 1% presenta 6 sitios (Vitales et al., 2017). Dentro de esta base de datos no hay ninguna información reportada para el género *Physalis*, sin embargo existe un estudio reciente en poblaciones cultivadas de aguaymanto realizado por Siles et al. (2021), donde reporta 6 sitios de ADNr 5s y en menor porcentaje 4 sitios. En el presente trabajo, también se está reportando 6 sitios para ADNr 5s con una pequeña variación intrapoblacional de 4 y 7 sitios para las poblaciones cultivadas (Figura 9). Por lo tanto, el número de sitios ADNr 5s para *Physalis peruviana* no sería el común dentro de la familia Solanaceae, además seria relativamente alto en comparación con otros géneros que presentan estudios a nivel citomolecular como el de *Solanum,* donde se reporta una mayor prevalencia de 2 sitios ADNr 5s y en menor proporción 4 sitios (Garcia et al., 2017; Rego et al., 2009; Pendinen et al., 2008; Moyetta et al., 2017); *Capsicum*, donde predomina un número de sitios de 2 para el ADNr 5s (Aguilera et al., 2016; Romero-da et al., 2015; Kwon, y Kim, 2009; Park et al., 2000; Youn-kyu et al., 1999); *Nicotiana*, se alterna entre 2 y 4 sitios de ADNr 5s (Kovarik et al., 2004; Matyasek et al., 2003; Kitamura et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Fulnecek et al., 2002); y *Cestrum*, reportándose solo especies con 2 sitios ADNr 5s (Fregonezi et al., 2006; Fernandes et al., 2009; Urdampilleta et al., 2014). Las únicas especies que comparten el mismo número de sitios de ADNr 5s que el aguaymanto dentro de la familia Solanaceae son *Jaborosa laciniata* (Chiarini et al., 2016) y *Nicotiana setchellii* (Lim et al., 2000). Este número relativamente alto de sitios de ADNr, para las poblaciones de aguaymanto, podría estar relacionado al nivel de ploidía que presenta en relación al número básico de cromosomas de la familia Solanaceae x=12, siendo el aguaymanto 4x=2n=48 (Carbajal et al., 2021; Garcia et al., 2017). Por otro lado, al no haber mas estudios dentro del género Physalis no se podría afirmar que el número de sitios ADNr 5s es propio del género o un evento puntual de la propia especie dentro del género atribuido a una evolución temprana, esto debido a que en especies con numerosos sitios de ADNr en comparación a su estándar taxonómico, no todos serian transcripcionalmente activos y

que durante el proceso de evolución posterior estos tendrían a desaparecer mediante un proceso diploidizante, reduciendo así el número de loci por genoma monoploide cuando aumenta el nivel de ploidía (Garcia et al., 2017; Lopez et al., 2021; Báez et al., 2020). En este estudio, también se ha observado una menor variabilidad con respecto al número de sitios para el ADNr 5s en comparación con el número de sitios de ADNr 45s en las poblaciones de aguaymanto (Figura 9 y Tabla 4). Esta característica ya se ha observado en la mayoría de los grupos de angiospermas y gimnospermas analizadas citomolecularmente mediante FISH, coincidiendo en que el número de sitios de ADNr 5s es más estable que el número de sitios de ADNr 45s (Garcia et al., 2017).

Con respecto al número de sitios de ADNr 45s se sabe que para el género *Physalis* no hay estudios previos que informen sobre los sitios ADNr 45s, siendo este estudio el primero en reportarlo con la especie de Aguaymanto. Se ha observado un número de sitios ADNr 45s de 2, 4 y 6 entre las poblaciones de aguaymanto estudiadas, con un predominio de 4 y 2 señales ADNr 45s para las poblaciones Silvestres y Cultivadas respectivamente (Figura 9). Esta marcada variabilidad entre ambas poblaciones dentro de una misma especie se puede explicar por la naturaleza del locus ADNr 45s, debido a que este suele presentar una alta actividad transcripcional, convirtiéndolo en un sitio frágil en el cromosoma, esto conlleva a que exista una alta probabilidad de que se produzcan roturas cromosómicas en la región del ADNr y conlleve a un reordenamiento cromosómico, lo cual a su vez, durante la meiosis ocurra cruces desiguales o ectópicos; favoreciendo de esta manera a la alta variabilidad en el número de sitios de ADNr 45s (Kobayashi, 2011; Su et al., 2020). Esta variabilidad de locus ADNr 45s visto en aguaymanto, también se ha observado en varios géneros de la familia Solanaceae, como en el de *Solanum* que presenta un número de sitios entre 2 a 4 (Moyetta et al., 2017; Rego et al., 2009; Pendinen et al., 2008); en otros generos la variabilidad es aun mayor como en *Capsicum,* teniendo un número entre 2, 4 ,6 ,8 y hasta 16, 24,28, 36 de sitios 45s ADNr (Romero-da et al., 2015; Scaldaferro et al., 2006; Kwon, y Kim, 2009;

Youn-kyu et al., 1999); o como también en el género *Nicotiana*, reportándose un número de sitios ADNr 45s de 2, 4, 6 y en menor proporción de 8 y 10 (Kovarik et al., 2004; Matyasek et al., 2003; Kitamura et al., 2001; Lim et al., 2000; Nakamura et al., 2001; Matyasek et al., 2003). Esta variabilidad interespecífica e intraespecífica del número de sitios 45s, también ya ha sido reportado en otras familias de plantas, lo cual demuestra su naturaleza inestable (Garcia et al., 2017). Por otro lado, este predominio de 4 y 2 sitios de ADNr 45s reportado para las poblaciones de aguaymanto concuerda con la mayoría de los géneros dentro de las Solanáceas, de acuerdo a la base de datos de Plant rDNA Database, donde el 66% de especies de Solanáceas con información para el ADNr 45s, presentaban un número de sitios entre 2 o 4 (Vitales et al., 2017).

De acuerdo a la relación del número de loci ADNr 45s y 5s dentro de la Plant rDNA Database, la mayoría de las especies angiospermas tienen más loci ADNr 45s que ADNr 5s (47,79% de los cariotipos), aunque para el 19,05% ocurre lo contrario; el resto (33,16%) tiene el mismo número de loci (Garcia et al., 2017). Al buscar en la misma base datos para las *Solanáceas*, se encontró que de 195 resultados el 81% presentaba un número de loci ADNr 45s mayor que el 5s, un 17% presentaba un mismo número de sitios ADNr y solo un 2% (4 especies) presentaban un número de loci ADNr 5s mayor que el de ADNr 45s, específicamente 4 sitios 5s y 2 sitios 45s (Vitales et al., 2017). Particularmente estas cuatro especies eran: *Jaborosa caulescens*, *Sclerophylax spinescens*, *Solanum angustifidum* y *Solanum crispum* (Chiarini et al., 2016; Moyetta et al., 2017). Los resultado en este estudio presentan un número de loci ADNr 5s mayor que el 45s, siendo el número de sitios predominante en las poblaciones de aguaymanto estudiadas de 6 para el ADNr 5s y de 2 y 4 para el ADNr 45s (Figura 9). Este sería el primer reporte con esta relación de números de sitios ADNr 45s y 5s dentro del cariotipo de una especie para la Familia Solanaceae y la primera especie caracterizada citomolecularmente en el género *Physalis*.

Con respecto a la variación del número de sitios ADNr que se presenta entre las poblaciones, las silvestres serían más constantes en cuanto a la proporción del número de sitios ADNr 5s y 45s, ya que no presentan variaciones significativas entre estas, mientras que las poblaciones cultivadas solo se conservan en el porcentaje del número de sitios ADNr 5s y tienen diferencia significativa en el porcentaje del número de sitios de ADNr 45s (Tabla 4). Es por esto que considerando solo el porcentaje en conjunto de los números de sitios ADNr 45s y 5s, las poblaciones silvestres y cultivadas difieren entre sí por el número de sitios ADNr. Además entre las poblaciones silvestres no habría diferencia entre sí, mientras tanto entre las cultivadas diferirían por el número de sitios ADNr 45s. Esta variación intraespecífica entre los números de sitios ADNr 5s y 45s encontrada dentro de una misma especie, ya ha sido observado en trabajos realizados por el mismo o diferentes grupos de investigación. Esto se refleja en el Plant rDNA database, donde solo el 50.9% de especies que presentan distintos trabajos reportan el mismo resultado; mientras que el resto informa resultados diferentes (Garcia et al., 2017). Esto último demuestra el grado de polimorfismo que puede tener los loci ADNr 45s y 5s en los cromosomas dentro de una especie y su utilidad como marcador genético para el estudio y caracterización de la diversidad genética.

La información de la base de datos de Plant rDNA Database, muestra que de las 103 especies de la familia Solanaceae que presentaban un nivel de ploidía de dos y un número de cromosomas de 24, 90 de estas (89.3%) presentaban solo 2 sitios de ADNr 5s y el resto entre 4 y 6 (10.7%). Esto correlacionaría a las especies diploides de las solanáceas con 2 sitios de ADNr 5s. Con respecto a las especies de solanáceas que presentan un nivel de ploidía de cuatro con 48 cromosomas, no es posible establecer una relación de ploidía, porque solo habían 6 y 10 especies con 2 y 4 sitios ADNr 5s respectivamente. De igual manera no se pudo correlacionar con el número de sitios de ADNr 45s con el nivel de ploidía, por la alta variabilidad que presenta en las especies de Solanaceae (Vitales et al., 2017). El número cromosómico de las poblaciones de

aguaymanto analizadas fue de 48, y de acuerdo al número básico X=12 para la familia Solanaceae, sería tetraploides; sin embargo con lo mencionado anteriormente y el número de sitios de ADNr 5s reportados en este estudio, se podría decir que las poblaciones presentaría un nivel de ploidía mayor que dos.

7.3. Distribución de los sitios ADNr 45s y 5s en los cromosomas

La posición del ADNr 5s en los brazos cromosómicos de las poblaciones Cultivadas y Silvestre de aguaymanto reportadas en este estudio se encuentran en las tres ubicaciones posibles: telomérico, intersticial o centromérico (Figura 15). De acuerdo a Garcia et al. (2017) la ubicación ancestral que tendrían las plantas para el ADNr 5s sería intersticial o centromérico. Para la familia *Solanaceae* según una revisión en la Plant rDNA Database, las especies descritas mediante citogenética molecular muestran una posición de ADNr 5s variable con las tres posibles opciones disponibles: telomérico, intersticial o centromérico (Vitales et al., 2017). Esto último concuerda con lo reportado en el presente estudio, además se observa una gran variabilidad en la posición de los sitios de ADNr 5s en las poblaciones estudiadas reportando 5 de los 9 tipos de cromosomas con un sitio de ADNr 5s: *N1*, *N3*, *S3*, *C1* y *C2* (Figura 14 y 15). Esta variabilidad de posición ha contribuido a la caracterización de las poblaciones mediante los cromosomas que presentaban hibridación, reflejando una vez mas su potencial como marcadores citogenéticos (Olanj et al., 2015; Su et al. 2020). Esta gran variabilidad de los sitios ADNr 5s en aguaymanto, puede deberse a la actividad de elementos genéticos móviles, debido a que hay reportes donde se ha encontrado fragmentos combinados de secuencias de transposones con secuencias de genes ribosomales (Kapitonov y Jurka, 2003; Raskina et al., 2004), sin embargo para confirmar que los transposones sean la principal causa en la cantidad numerosa de sitios ADNr 5 en aguaymanto, sería necesario su estudio a nivel de secuencia de cada uno de los locus. Por otro lado, el origen los cromosomas propios de las poblaciones silvestres (S3) y cultivadas (C1 y C2), que contienen sitios de ADNr 5s, pudo surgir a causa de varios eventos de hibridación

producidos por la agricultura con fines de mejora de cultivos, los cuales producen reordenamientos cromosómicos (Bashir et al., 2018; Su et al., 2020), pudiendo actuar en conjunto con los efectos derivados de los elementos genéticos móviles anteriormente mencionados.

Con respecto a la posición del ADNr 45s, se ha observado en numerosas especies de plantas que este suele situarse en los extremos terminales o en los satélites de los cromosomas, pero cuando existen varios locus del ADNr 45s la posición terminal en los cromosomas disminuye porcentualmente (Garcia et al., 2017; Roa y Guerra, 2012; Su et al. 2020). En el presente estudio, este tipo de posición terminal del ADNr 45s solo se observa en el cromosoma *N2* y *CC*, mientras que los otros cromosomas que también presentaban 45s, se ubica en el brazo q en posición intersticial (Figura 14). Además en comparación con la variabilidad de posición del ADNr 5s en los cromosomas, el ADNr 45s muestra poca variabilidad entre los cuatro tipos de cromosomas descritos en el estudio: *N2*, *S1*, *S2* y *CC*. Esto último estaría reflejando una variabilidad más limitada en cuanto a la posición del ADNr 45s en los cromosomas en comparación con el ADNr 5s, está tendencia ya se ha observado en varias especies de angiospermas (Garcia et al., 2017). Los cromosomas que no presentan el ADNr 45s en la posición terminal no se encuentran conservadas entre las poblaciones de aguaymanto estudiadas, a diferencia del *N2* que si lo está, esto podría deberse a que la posición ancestral del ADNr 45s en plantas se reconstruye como terminal y además esta posición facilita las frecuencias más altas de homogenización entre locus a diferencia de las otras posiciones centromérica o intersticiales, todo eso esto influye en las evoluciones de las matrices de ADNr en las plantas, donde la selección actúa favorablemente en individuos con matrices homogeneizadas (Eickbush y Eickbush, 2007). Por otro lado se sabe que los sitios de ADNr 45s están involucrados en la formación de los nucleolos, sin embargo no todos los sitios son necesarios para la formación de esta región del núcleo, más aun si el complemento cromosómico presenta numerosos sitios de este ADNr (Báez et al.,

2020). Esto sugeriría que los 4 tipos de cromosomas que presentan sitios ADNr 45s en este estudio no necesariamente estarían involucrados en la formación del nucleolo, en especial los que no son conservados en todas las poblaciones: *S1*, *S2* y *CC*. Además ningún cromosoma presentaba satélite en los sitios ADNr 45s, los cuales están usualmente relacionados con las regiones organizadoras nucleolar (Long y Dawid, 1980; Lopez et al., 2021). Sin embargo debido a que el cromosoma *N2* se conserva en todas las poblaciones de aguaymanto, es casi seguro que si sería un sitio de ADNr 45s completamente funcional, debido a que presenta una frecuencia del 100% en todos los campos observados y es el único tipo de cromosoma que presenta este ADNr en la población de Ayacucho Cultivado, esto último concuerda con lo propuesto por Garcia et al. (2017), cuando un cariotipo muestra un solo locus de ADNr 5s o 35s, entonces ese locus debe ser funcional.

Cabe destacar que la funcionalidad de los genes ribosomales en los locus ADNr no va a depender de su posición en el cromosoma, sin embargo hay ciertas posiciones donde la disminución de la actividad transcripcional puede estar relacionada a eventos genéticos. Este es el caso de las posiciones centroméricas, donde existe una probabilidad de que ocurra silenciamiento génico debido a procesos de heterocromatización asociados con el centrómero. De acuerdo a las frecuencias de posición, el locus 5s estaría más propenso a este evento a diferencia del locus 45s donde su posición es preferentemente terminal (Vaillant et al., 2007). En base a esto, los cromosomas que presentan ADNr muy cerca al centrómero: *N3*, *S1* (Ayacucho) y *S2* (Cajamarca); podrían estar afectados por la heterocromatización del centrómero.

7.4. Morfología de los cromosomas e intensidad de fluorescencia

Gracias al polimorfismo del número de sitios y su posición en los cromosomas de los loci ADNr, se pudo describir 9 tipos de cromosomas que presentaban hibridación entre las poblaciones de aguaymanto estudiadas, estos cromosomas con hibridación también permitieron ser analizados en base a su morfometria e intensidad de fluorescencia de

la señal ADNr de un mismo tipo de cromosoma entre diferentes poblaciones (Tabla 5 y 7, Figura 16).

La variabilidad en cuanto a la longitud del cromosoma y el índice braquial, podrían reflejar si el mismo tipo de cromosoma con hibridación estaría perteneciendo o no, al mismo número de par cromosómico con respecto al complemento cromosómico de cada población, esto debido a que los loci de ADNr que presenta un mismo cromosoma puede variar en cuanto a que numero de par cromosómico se encuentran establecido dentro del complemento cromosómico de la especie (Aguilera et al., 2016). Esto último se vuelve relativamente mas sencillo si la especie presenta un número pequeño de cromosomas con un tamaño grande para así poder determinar su cariotipo completo, sin embargo el aguaymanto presentan todo lo contrario, además de presentar un cariotipo muy homogéneo que dificulta la reproducibilidad durante las mediciones en cada campo metafásico para la determinación de su cariotipo (Carbajal, 2018). Por otra parte, estas variaciones morfométricas también nos podría indicar el polimorfismo que pueda presentar el mismo par cromosómico dentro una especie (Zolan, 1995; Wilkie et al., 1991; Chakraborty y Chakraborty, 1984). Estas variables morfométricas se suman con el de intensidad de fluorescencia de la señal de las sondas al momento de hibridar el locus ADNr en el FISH, el cual se ha visto que se relaciona directamente con el número de repeticiones del ADNr que presenta el locus (Prado et al., 1996). Además durante el análisis de metafases en este estudio, esta intensidad de fluorescencia ha sido de gran ayuda durante la caracterización e identificación de los cromosomas homólogos que presentan hibridación en este estudio.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado y a la Tabla 5 y Figura 16, el cromosoma *N1* mostró no tener variaciones morfométricas ni de intensidad de fluorescencia entre las poblaciones, lo cual sugiere que sería el mismo par cromosómico entre todas las poblaciones de aguaymanto. Por otro lado, el cromosoma *N2* que presenta la población de Ayacucho Silvestre no correspondería al mismo par cromosómico respecto a las

otras poblaciones, esto debido a que presenta una longitud de cromosoma e intensidad de fluorescencia ADNr 45s significativamente mayor a las otras poblaciones. Esto sugiere que presenta más copias de ADNr 45s por tener mas fluorescencia, y por lo tanto un mayor repertorio genético para una mayor tasa de transcripción de los genes ribosomales, sin embargo se necesitaría confirmarlo con estudios adicionales, ya que se sabe que pueden existir repeticiones silenciosas de ADNr que pueden actuar como copias de "respaldo" para la biogénesis de los ribosomas y desempeñar funciones de organización nuclear (Lopez et al., 2021). Con respecto al cromosoma *N3*, se observó una intensidad de fluorescencia constante entre todas las poblaciones; la longitud del cromosoma en la población de Ayacucho silvestre es significativamente mayor al resto; además se observó que el índice braquial es mayor en las poblaciones Silvestres que en las Cultivadas, lo cual mostraría un mayor tamaño del brazo q. Por otro lado se ha visto que durante el análisis de los campos metafásicos, este tipo de cromosoma *N3* era el más pequeño de todo los cromosomas observados en el campo, por lo tanto vendría a ser el último par cromosómico en todas las poblaciones. Por todo lo anteriormente mencionado para el *N3*, este cromosoma acrocéntrico tendría un polimorfismo marcado en el brazo q entre las poblaciones Silvestres y Cultivadas. Para el cromosoma *S3*, se observa conservación en la intensidad de fluorescencia e índice braquial, pero el tamaño de la longitud del cromosoma es significativamente mayor en la población de Ayacucho silvestre frente a la de Cajamarca silvestre, lo cual reflejaría un polimorfismo de *S3* para esta variable en las poblaciones Silvestres. Esto mismo aplicaría para el cromosoma *C1* con respecto a los datos de índice braquial (Tabla 5 y Figura 16).

La baja frecuencia observada de los cromosomas *S1* en la población de Ayacucho Silvestre, *S2* en la población de Cajamarca Silvestre y *C2* en las poblaciones cultivadas, no permitió establecer un análisis con base estadística con respecto a sus características morfológicas e intensidad de fluorescencia entre las poblaciones (Tabla 7), sin embargo estos cromosomas si son consideradas para el análisis y caracterización

mediante el número de sitios y posición del ADNr, como se ha ido discutiendo párrafos arriba.

8. CONCLUSIONES

- Las poblaciones de aguaymanto presentan 6 sitios de ADNr 5s, con pequeñas variaciones intraespecíficas de 4 y 7 en las poblaciones cultivadas.
- El número de sitios predominantes de ADNr 45s es de 2 y 4 para las poblaciones de aguaymanto cultivadas y silvestre respectivamente, con variación intraespecífica de 2, 4 y 6 para las poblaciones silvestres, y de 2 y 4 para la población de Cajamarca Cultivado.
- Mediante la tinción con DAPI se identificaron 9 tipos de cromosomas en base a su morfología, posición del ADNr 45s o 5s y su presencia en las poblaciones de aguaymanto. Los cromosomas *N1*, *N2*, y *N3* se conservaban en todas las poblaciones; *S1*, *S2* y *S3* en las poblaciones silvestres; *C1* y *C2* en las poblaciones cultivadas; y *CC* solo en la población de Cajamarca Cultivado.
- Los 9 tipos de cromosomas con hibridación lograron caracterizar a las poblaciones cultivadas y silvestres, al resaltar las diferencias en cuanto a frecuencia y presencia de estos cromosomas en los campos metafásicos observados en cada población.
- El análisis de las variables de longitud total del cromosoma, índice braquial e intensidad de fluorescencia entre los mismos tipos de cromosoma con hibridación; permitieron visualizar las diferencias morfológicas y fluorescentes que habían entre los mismos tipos de cromosomas a lo largo de las poblaciones.
- Existen diferencias a nivel citogenético molecular entre las poblaciones cultivadas y silvestres de aguaymanto, con variaciones intraespecíficas entre estas poblaciones.

9. RECOMENDACIONES

- Ampliar las zonas de estudio para abarcar otras áreas geográficas y poder caracterizar genéticamente diferentes poblaciones y explorar sus características de interés agronómico.
- Para tener una mayor resolución del cariotipo de las poblaciones de aguaymanto se recomienda ampliar los estudios mediante técnicas como el Oligo-FISH.
- Se necesitan estudios citogenético moleculares en otras especies del género *Physalis* para llenar el vacío de información citotaxonómica que presenta actualmente este género.
- Se recomienda la tinción con nitrato de plata para confirmar los sitios ADNr 45s activos en el análisis cromosómico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABD EL-TWAB, Magdy Hussein y KONDO, Katsuhiko. Physical mapping of 5S and 45S rDNA in Chrysanthemum and related genera of the Anthemideae by FISH, and species relationships. *Journal of genetics*. 2012. Vol. 91, no. 2, p. 245–249.

AGUILERA, Patricia M., DEBAT, Humberto J., SCALDAFERRO, Marisel A., MARTÍ, Dardo A. y GRABIELE, Mauro. FISH-mapping of the 5S rDNA locus in chili peppers (Capsicum-Solanaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2016. Vol. 88, no. 1, p. 117–125.

ALEXANDROV, Oleg y KARLOV, Gennady . The Development of New Species-Specific Molecular Markers Based on 5S rDNA in Elaeagnus L. Species. *Plants*, 2021, vol. 10, no 12, p. 2713.

ALIYEVA-SCHNORR, Lala, MA, Lu y HOUBEN, Andreas. A fast air-dry dropping chromosome preparation method suitable for FISH in plants. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2015. No. 106, p. e53470.

ARROYO MARTÍNEZ, Hugo Abelardo. “Determinación del cariotipo y mapeo físico de los genes 5s y 45s rDNA en *Tigridia pavonia* variedad Dulce”. Tesis de Grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Autónoma del Estado de México. Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, México, 2016.

AVILA RODRIGUEZ, Carmen Livia. “Biol y ácidos húmicos en la propagación de plantines de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) bajo condiciones de invernadero”. 2013. Asesor: Dennis Macedo Valdivia. Tesis de Título Profesional. UNSA. Escuela Profesional y Académica de Agronomía, Arequipa, 2013.

AZEEZ, S. O. y FALUYI, J. O. Karyotypic studies of four Physalis species from Nigeria. *Acta botanica Hungarica*. 2019. Vol. 61, no. 1–2, p. 5–9.

BÁEZ, Mariana, SOUZA, Gustavo y GUERRA, Marcelo. Does the chromosomal position of 35S rDNA sites influence their transcription? A survey on Nothoscordum species (Amaryllidaceae). *Genetics and molecular biology*. 2020. Vol. 43, no. 1, p. e20180194.

BASHIR, Tufail, CHANDRA MISHRA, Ratnesh, HASAN, Md Mohidul, MOHANTA, Tapan Kumar y BAE, Hanhong. Effect of hybridization on somatic mutations and genomic rearrangements in plants. *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19, no. 12, p. 3758.

BENAVENTE, E., CIFUENTES, M., DUSAUTOIR, J. C. y DAVID, J. The use of cytogenetic tools for studies in the crop-to-wild gene transfer scenario. *Cytogenetic and genome research*. 2008. Vol. 120, no. 3–4, p. 384–395.

BENLIOGLU, Berk & ADAK, Mehmet. Importance of Crop Wild Relatives and Landraces Genetic Resources in Plant Breeding Programmes. *Journal of Experimental Agriculture International*, 2019, vol. 37(3), p. 1-8.

BENN, Peter y DELACH, Judith. Human lymphocyte culture and chromosome analysis. *CSH protocols*. 2008. Vol. 2008, no. 10, p. db.prot5035.

BERDUGO, Jhon, RODRÍGUEZ, Felix, ALMARIO, Carolina y BARRERO, Luz. VARIABILIDAD GENÉTICA DE PARENTALES Y POBLACIONES F1 INTER E INTRAESPECÍFICAS DE *Physalis peruviana* L. Y *P. floridana* Rydb. *Revista brasileira de fruticultura*. 2015. Vol. 37, no. 1, p. 179–192.

BRAMMER, Sandra, VASCONCELOS, Santelmo, POERSCH, Liane, OLIVEIRA Ana, BRASILEIRO-VIDAL, Ana. Genomic *in situ* hybridization in Triticeae: A methodology approach. In: S.B. Andersen editor. Plant breeding from laboratories to fields. *InTech, London*. 2013, p. 1-22.

BRAZ, Guilherme T., HE, Li, ZHAO, Hainan, ZHANG, Tao, SEMRAU, Kassandra, ROUILLARD, Jean-Marie, TORRES, Giovana A. and JIANG, Jiming. Comparative oligo-

FISH mapping: An efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution. *Genetics*. 2018. Vol. 208, no. 2, p. 513–523.

CARBAJAL GONZALES, Yajahaira Nevenka. “Caracterización citogenética de tres ecotipos de Physalis peruviana “Aguaymanto” provenientes del departamento de Cajamarca: Diversidad y evolución. Asesora: Maria Siles Vallejos. Tesis de Título Profesional. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología.UNMSM, Lima, 2018.

CARBAJAL, Yajahaira, BONILLA, Henry, SILES-VALLEJOS, María y LÓPEZ, Alberto. Citogenética comparativa de *Physalis peruviana* en tres poblaciones cultivadas de Cajamarca, Perú. *Revista peruana de biología*. 2021. Vol. 28, no. 2, p. e20462.

CHAKRABORTY, B. M. y CHAKRABORTY, R. Variations in the length of human Y chromosome: a statistical study. Acta anthropogenética. 1984. Vol. 8, no. 3–4, p. 269–275.

CHIARINI, Franco, MORENO, Natalia, MORÉ, Marcela y BARBOZA, Gloria. Chromosomal changes and recent diversification in the Andean genus Jaborosa (Solanaceae). *Botanical journal of the Linnean Society*. 2016. Vol. 183, no 1, p. 57-74.

CIFUENTES, Marta, BLEIN, Melisande and BENAVENTE, Elena, 2006. A cytomolecular approach to assess the potential of gene transfer from a crop (*Triticum turgidum* L.) to a wild relative (*Aegilops geniculata* Roth.). *Theoretical and applied genetics*. 2006. Vol. 112, no. 4, p. 657–664.

CORREIA, J.J. y STAFFORD, W.F. Sedimentation velocity: A classical perspective. En: J.L. COLE (ed.), *Methods in enzymology*. 2015. Vol. 562, pp. 49–80.

COTERA CALUA, Yherson Roly. “Análisis de la cadena de valor de la cooperativa productores unidos para el desarrollo de Bambamarca productora de aguaymanto para el aumento de la oferta exportable al mercado español, 2021” Asesor: Anthony Rabanal

Soriano. Tesis de Título Profesional. UPAGU. Carrera Profesional de Administración y Negocios Internacionales, Cajamarca, 2021.

CRUZAT Rodrigo y HONORATO Constanza. Resultados y lecciones en Cultivo de Golden berry (*Physalis peruviana L.*) en la zona central de Chile. *Fundación para la Innovación Agraria (FIA)*. Julio 2010; 90: 1-58.

CUI, Chenghua, SHU, Wei y LI, Peining. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016. Vol. 4, p. 89.

DOUET, J. y TOURMENTE, S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenétically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. 2007. Vol. 99, no. 1, p. 5–13.

EICKBUSH, Thomas H. y EICKBUSH, Danna G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*. 2007. Vol. 175, no. 2, p. 477–485.

EISEL, Doris, SETH, Oliver, GRÜNEWALD-JANHO, Stefanie. y KRUCHEN, Bettina. DIG application manual for nonradioactive in situ hybridization 4th Edition. *Roche Diagnostics*, Mannheim, Germany, 2008.

FENTIK Damtew. Review on Genetics and Breeding of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Advances in Crop Science and Technology*, 2017, Vol. 5: 306.

FERNANDES, Thiago, DE ALMEIDA REGO, Letícia do Nascimento Andrade, NARDY, Mariana, YUYAMA, Priscila Mary y VANZELA, André Luís Laforga. Karyotype differentiation of four Cestrum species (Solanaceae) revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. *Genetics and molecular biology*. 2009. Vol. 32, no. 2, p. 320–327.

FISCHER, Gerhard, MIRANDA Diego, PIEDRAHITA Wilson y ROMERO, Jorge. Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en

Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Sede Bogotá, 2005.

FISCHER, Gerhard, ALMANZA-MERCHÁN, Pedro José. y MIRANDA, Diego. Importancia y cultivo de la uchuva (Physalis peruviana L.). *Revista brasileira de fruticultura*. 2014. vol. 36, no. 1, pp. 01–15.

FITZPATRICK Martin. The Open Lab Book Release 1.0. *Readthedocs.org* [online].2021. p. 50-53. [Consultado el 21 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://buildmedia.readthedocs.org/media/pdf/theolb/latest/theolb.pdf

FREGONEZI, Jéferson Nunes, FERNANDES, Thiago, TOREZAN, José Marcelo Domingues, VIEIRA, Ana Odete S. y VANZELA, André Luís Laforga. Karyotype differentiation of four Cestrum species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genetics and molecular biology*. 2006. Vol. 29, no. 1, p. 97–104.

FULNECEK, J., LIM, K. Y., LEITCH, A. R., KOVARÍK, A. y MATYÁSEK, R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity*. 2002. Vol. 88, no. 1, p. 19–25.

GALIÁN, J. A., ROSATO, M. y ROSSELLÓ, J. A. Early evolutionary colocalization of the nuclear ribosomal 5S and 45S gene families in seed plants: evidence from the living fossil gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Heredity*. 2012. Vol. 108, no. 6, p. 640–646.

GARCÍA, Francy, OSORIO, Jaime y NÚÑEZ, Victor. Association Study Reveals Novel Genes Related to Yield and Quality of Fruit in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2018, Vol. 9, p.362.

GARCIA, Sònia, KOVAŘÍK, Ales, LEITCH, Andrew R. y GARNATJE, Teresa. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 2017. Vol. 89, no. 5, p. 1020–1030.

GUPTA S. M. y KUMAR A. “Nucleic Acid Probe Technology”. In: Biotechnology in medicine and agriculture: principles and practices. I. K. *International publishing house Pvt. Ltd.*, New Delhi, India, 2012, pp. 60-88.

HADZIAVDIC, Kenan, LEKANG, Katrine, LANZEN, Anders, JONASSEN, Inge, THOMPSON, Eric M. y TROEDSSON, Christofer. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS one*. 2014. Vol. 9, no. 2, p. e87624.

HERRERA M, Axel M., ORTIZ A, Julián D., FISCHER, Gerhard y CHACÓN S, María I. Behavior in yield and quality of 54 cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) accessions from north-eastern Colombia. *Agronomia colombiana*. 2011. Vol. 29, no. 2, p. 382–389.

HERRERA, Juan Carlos. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomia colombiana*. 2007. Vol. 25, no. 1, p. 26–35.

HICKEY, Lee T., N HAFEEZ, Amber, ROBINSON, Hannah, JACKSON, Scott A., LEAL-BERTIOLI, Soraya C. M., TESTER, Mark, GAO, Caixia, GODWIN, Ian D., HAYES, Ben J. y WULFF, Brande B. H. Breeding crops to feed 10 billion. *Nature biotechnology*. 2019. Vol. 37, no. 7, p. 744–754.

JIANG, Guo-Liang. Molecular marker-assisted breeding: a plant breeder’s review. Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools. *Springer, Cham*. 2015. p. 431-472.

JIANG, Guo-Liang. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant breeding from laboratories to fields*, 2013, p. 45-83

KAPITONOV, Vladimir V. y JURKA, Jerzy. A novel class of SINE elements derived from 5S rRNA. *Molecular biology and evolution*. 2003. Vol. 20, no. 5, p. 694–702.

KAPUSCINSKI, Jan. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotechnic & histochemistry: official publication of the *Biological Stain Commission*. 1995. Vol. 70, no. 5, p. 220–233.

KARAHAN, Gurbet, SAYAR, Nilufer, GOZUM, Gokcen, BOZKURT, Betul, KONU, Ozlen y YULUG, Isik G. Relative expression of rRNA transcripts and 45S rDNA promoter methylation status are dysregulated in tumors in comparison with matched-normal tissues in breast cancer. *Oncology reports*. 2015. Vol. 33, no. 6, p. 3131–3145.

KITAMURA, S., INOUE, M., SHIKAZONO, N. y TANAKA, A. Relationships among Nicotiana species revealed by the 5S rDNA spacer sequence and fluorescence in situ hybridization. *Theoretical and applied genetics*. 2001. Vol. 103, no. 5, p. 678–686.

KOBAYASHI, Takehiko. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cellular and molecular life sciences*: *CMLS*. 2011. Vol. 68, no. 8, p. 1395–1403.

KOPCOW, Laura, BISIOLI, Claudio, GOMEZ, Mariana, MATAYOSHI, Tetsuji, DE ZUÑIGA, Ignacio, HORTON, Marcos. Sondas de oligonucleótidos para FISH: primer reporte de su utilización para screening de aneuploidías en blastómeras humanas. *Reproducción*. 2009, vol. 24, p. 56-61.

KOVARIK, A., MATYASEK, R., LIM, K. Y., SKALICKÁ, K., KOUKALOVÁ, B., KNAPP, S., CHASE, M. y LEITCH, A. R. Concerted evolution of 18-5.8-26S rDNA repeats in Nicotiana allotetraploids: INTERLOCUS GENE CONVERSION OF rDNA. Biological journal of the Linnean Society. *Linnean Society of London*. 2004. Vol. 82, no. 4, p. 615–625.

KOYANI, Preeti R. y SAIYAD, S. S. Study of effect of colchicine exposure on length of chromosome during mitosis. *Journal of the Anatomical Society of India*. 2011. Vol. 60, no. 2, p. 177–180.

KUZOFF, R. K., SWEERE, J. A., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. y ZIMMER, E. A. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Molecular biology and evolution*. 1998. Vol. 15, no. 3, p. 251–263.

KWON, Jin-Kyung y KIM, Byung-Dong. Localization of 5S and 25S rRNA genes on somatic and meiotic chromosomes in Capsicum species of chili pepper. *Molecules and cells*. 2009. Vol. 27, no. 2, p. 205–209.

LEÓN CARRASCO, José Carlos. Exportaciones peruanas de aguaymanto alcanzaron las 288 toneladas por US$ 2.659.000 en 2020. *Agraria.pe Agencia Agraria de Noticias* [en línea], [Mayo 2021]. [Consulta: Diciembre 2021]. Disponible en: https://agraria.pe/noticias/exportaciones-peruanas-de-aguaymanto-alcanzaron-las-288-tone-24284.

LIBERATO, Sara, SÁNCHEZ-BETANCOURT, Erika, ARGÜELLES, Jorge, GONZÁLEZ, Carolina, NÚÑEZ, Víctor, BARRERO, Luz. Citogenética de genotipos de uchuva, *Physalis peruviana* L., y *Physalis floridana* Rydb., con respuesta diferencial a *Fusarium oxysporum*. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*. 2014, vol. 15, no 1, p. 51-61.

LIM, K. Y., MATYÁSEK, R., LICHTENSTEIN, C. P. y LEITCH, A. R. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the Nicotiana section Tomentosae. *Chromosoma*. 2000. Vol. 109, no. 4, p. 245–258.

LONG, E. O. y DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. *Annual review of biochemistry*. 1980. Vol. 49, no. 1, p. 727–764.

LOPEZ, Francesca B., FORT, Antoine, TADINI, Luca, PROBST, Aline V., MCHALE, Marcus, FRIEL, James, RYDER, Peter, PONTVIANNE, Fr D. Ric, PESARESI, Paolo, SULPICE, Ronan, MCKEOWN, Peter, BRYCHKOVA, Galina y SPILLANE, Charles. Gene dosage compensation of rRNA transcript levels in *Arabidopsis thaliana* lines with reduced ribosomal gene copy number. *The plant cell*. 2021. Vol. 33, no. 4, p. 1135–1150.

MANDÁKOVÁ, Terezie y LYSAK, Martin A. Chromosome preparation for cytogenetic analyses in Arabidopsis. *Current protocols in plant biology*. 2016. Vol. 1, no. 1, p. 43–51.

MATYASEK, R., LIM, K. Y., KOVARIK, A. y LEITCH, A. R. Ribosomal DNA evolution and gene conversion in *Nicotiana rustica*. *Heredity*. 2003. Vol. 91, no. 3, p. 268–275.

MAXTED, Nigel and KELL, Shelagh. Establishment of a global network for the in situ conservation of crop wild relatives: status and needs. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome, Italy, 2009, vol. 266.

MCCOY, Patrick J., COSTELLO, Anthony J., CORCORAN, Niall M., HOVENS, Christopher M. y CLARKSON, Michael J. Preparation of fluorescent in situ hybridisation probes without the need for optimisation of fragmentation. *MethodsX*. 2019. Vol. 6, p. 22–34

MENZEL, Margaret Young. "The Cytotaxonomy and Genetics of Physalis." *Proceedings of the American Philosophical Society.* 1951. Vol. 95 (2), pp. 132-183.

MIRZAGHADERI, Ghader y MARZANGI, Karim. IdeoKar: an ideogram constructing and karyotype analyzing software. *Caryologia; giornale di citologia, citosistematica, e citogenética*. 2015. Vol. 68, no. 1, p. 31–35.

MIZUOCHI, Hitoshi; MARASEK, Agnieszka; OKAZAKI, Keiichi. Molecular cloning of Tulipa fosteriana rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in T. gesneriana and T. fosteriana. *Euphytica*, 2007, vol. 155, no 1, p. 235-248.

Mordor Intelligence. 2021. (en línea). "FRUIT AND VEGETABLE INGREDIENTS MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2021 - 2026)". Disponible en: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fruit-and-vegetable-ingredients-market. Revisado: Noviembre 2021.

MOYETTA, N. R., URDAMPILLETA, J. D., CHIARINI, F. E. y BERNARDELLO, G. Heterochromatin and rDNA patterns in Solanum species of the Morelloid and Dulcamaroid clades (Solanaceae). *Plant biosystems*. 2017. Vol. 151, no. 3, p. 539–547.

MUNIZ, Janaína, KRETZSCHMAR, Aike Anneliese, RUFATO, Leo, PELIZZA, Tânia Regina, RUFATO, Andrea De Rossi y MACEDO, Tiago Afonso de. General aspects of physalis cultivation. *Ciencia rural*. 2014. Vol. 44, no. 6, p. 964–970.

NAKAMURA, R., KITAMURA, S., INOUE, M., OHMIDO, N. y FUKUI, K. Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. *Theoretical and applied genetics*. 2001. Vol. 102, no. 6–7, p. 810–814.

NATH, J. y JOHNSON, K. L. A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*. 2000. Vol. 75, no. 2, p. 54–78.

NOHRA, C., RODRIGUEZ, C. y BUENO, M. Estudio de la Diversidad CITOGENÉTICA de *Physalis peruviana L.(Solanaceae). Acta Biológica Colombiana*. 2006, vol.11, n.2, pp.75-85.

OLANJ, Nayyereh, GARNATJE, Teresa, SONBOLI, Ali, VALLÈS, Joan y GARCIA, Sònia. The striking and unexpected cytogenetic diversity of genus Tanacetum L. (Asteraceae): a cytometric and fluorescent in situ hybridisation study of Iranian taxa. *BMC plant biology*. 2015. Vol. 15, no. 1, p. 174.

OTA. 2021(en linea). “U.S. organic sales soar to new high of nearly $62 billion in 2020”. Disponible en: https://ota.com/news/press-releases/21755 Revisado: Noviembre 2021.

PARK, Y. K., PARK, K. C., PARK, C. H. y KIM, N. S. Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five Capsicum species. *Molecules and cells*. 2000. Vol. 10, no. 1, p. 18–24.

PEDROSA-HARAND, Andrea, DE ALMEIDA, Cícero C. Souza, MOSIOLEK, Magdalena, BLAIR, Matthew W., SCHWEIZER, Dieter y GUERRA, Marcelo. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and applied genetics*. 2006. Vol. 112, no. 5, p. 924–933.

PENDINEN, Galina, GAVRILENKO, Tatjana, JIANG, Jiming y SPOONER, David M.. Allopolyploid speciation of the Mexican tetraploid potato species *Solanum stoloniferum* and *S. hjertingii* revealed by genomic in situ hybridization. *Genome*. 2008. Vol. 51, no. 9, p. 714–720.

PÉREZ, W., SALAS, A., RAYMUNDO, R., HUAMÁN, Z., NELSON, R., y BONIERBALE, M. Evaluation of wild species for resistance to late blight, in Scientist to farmer: partners in research for the 21st century. Program Report 1999–2000 International Potato Center, Lima 2001, pp. 49-62.

PRADO, E. A., FAIVRE-RAMPANT, P., SCHNEIDER, C. y DARMENCY, M. A. Detection of a variable number of ribosomal DNA loci by fluorescent in situ hybridization in Populus species. Genome. 1996. Vol. 39, no. 5, p. 1020–1026.

POGGIO, Lidia, CONFALONIERI, Viviana, COMAS, Cecilia, GONZALEZ, Graciela y NARANJO, Carlos A. Evolutionary relationships in the genus Zea: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. *Genetics and molecular biology*. 2000a. Vol. 23, no. 4, p. 1021–1027.

POGGIO, Lidia, CONFALONIERI Viviana, GONZALEZ Graciela, COMAS Cecilia, NARANJO Carlos A. Aportes de la citogenética molecular al análisis de divergencias genómicas crípticas en el género Zea (Poaceae). *Bol Soc Argent Bot*. , 2000b, vol. 35, p. 297-304.

PULIDO BRAVO, Edgar Andres. “Estandarización de la técnica de hibridación in situ para la detección de *Streptococcus agalactiae* en tejidos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) y su uso potencial en estudios epidemiológicos y de patogénesis”. Dirigido por:

Carlos Arturo Iregui. Tesis para optar título de Magister en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. Programa de Maestría en Salud y producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Bogotá, 2010.

RAMADAN, Mohamed Fawzy. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (Physalis peruviana): An overview. Food research international, 2011, vol. 44, no 7, p. 1830-1836.

RASKINA, Olga, BELYAYEV, Alexander y NEVO, Eviatar. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of Aegilops speltoides Tausch. Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology. 2004. Vol. 12, no. 2, p. 153–161.

RAVIKUMAR, Shamala, SUREKHA, R., THAVARAJAH, Rooban. Mounting media: An overview. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2014, vol. 3, no 5, p. 1.

REGO, L. N. A. A., DA SILVA, C. R. M., TOREZAN, J. M. D., GAETA, M. L. y VANZELA, Andre Luís Laforga. Cytotaxonomical study in Brazilian species of Solanum, Lycianthes and Vassobia (Solanaceae). *Plant systematics and evolution*. 2009. Vol. 279, no. 1–4, p. 93–102.

ROA, Fernando y GUERRA, Marcelo. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. BMC evolutionary biology. 2012. Vol. 12, p. 225.

RODRÍGUEZ, N.; BUENO, M. Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae).*Acta Biológica Colombiana*, Bogotá, 2006, Vol. 11, n. 2, p.75-85.

ROMERO-DA CRUZ, María Victoria, URDAMPILLETA, Juan Domingo, FORNI MARTINS, Eliana Regina y MOSCONE, Eduardo Alberto. Cytogenetic markers for the characterization of *Capsicum annuum* L. cultivars. *Plant biosystems*. 2015. P. 1–19.

ROSATO, Marcela, KOVAŘÍK, Aleš, GARILLETI, Ricardo y ROSSELLÓ, Josep A. Conserved organisation of 45S rDNA sites and rDNA gene copy number among major clades of early land plants. *PloS one*. 2016. Vol. 11, no. 9, p. e0162544.

SALIM, Devika y GERTON, Jennifer L. Ribosomal DNA instability and genome adaptability. Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology. 2019. Vol. 27, no. 1–2, p. 73–87.

SÁNCHEZ BETANCOURT, Erika Patricia. "Nivel de ploidía de plantas de uchuva provenientes de cultivo de anteras". Tesis de Grado de Magister en Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Bogotá, 2014.

SASTRI, D. C., HILU, K., APPELS, R., LAGUDAH, E. S., PLAYFORD, J. y BAUM, B. R. An overview of evolution in plant 5S DNA. Plant systematics and evolution. 1992. Vol. 183, no. 3–4, p. 169–181.

SCALDAFERRO, Marisel A., SEIJO, J. Gullermi, ACOSTA, M. Cristina, BARBOZA, Gloria E., DUCASSE, Daniel A. y MOSCONE, Eduardo A. Genomic characterization of the germplasm in peppers (Capsicum - Solanaceae) by fluorescent in situ hybridization. *Plant Science*. 2006. 43: 291-297.

SCHREIBER, Frank. Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) en condiciones de valles andinos. Sierra Exportadora, Perú, 2012, 2:23-24.

SHENSTONE, Esperanza, LIPPMAN, Zach y VAN ECK, Joyce. A review of nutritional properties and health benefits of Physalis species. *Plant foods for human nutrition* (Dordrecht, Netherlands). 2020. Vol. 75, no. 3, p. 316–325.

Sierra y Selva Exportadora. 2021. (en línea). "Análisis de Mercado del Aguaymanto 2015-2020". Disponible en: https://www.gob.pe/institucion/sse/informes-publicaciones/1745797-analisis-de-mercado-aguaymanto-2015-2020. Revisado: Noviembre 2021.

SILES-VALLEJOS, María; BRACAMONTE-GUEVARA, Olga; GARCIA-PAITAN, Marlon y LOPEZ-SOTOMAYOR, Alberto. Primer reporte sobre identificación del locus 5s rADN en cromosomas de *Physalis peruviana* L. *Scientia Agropecuaria*. 2021, vol.12, n.2, pp.149-153.

SINGH, Dharam y SINGH, Mahipal. Organization of 5S ribosomal RNA genes in tea (Camellia sinensis). Genome, 2001, vol. 44, no 1, p. 143-146.

SINGH, Namrata, SINGH, Samipta, MAURYA, Priyanka, ARYA, Malti, KHAN, Farheen, DWIVEDI, Deepa, y SARAF, Shubhini. An updated review on *Physalis peruviana* fruit: Cultivational, nutraceutical and pharmaceutical aspects. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2019, Vol.10(2):97-110.

SPEEL, E. J., SCHUTTE, B., RAMAEKERS, F. C. y HOPMAN, A. H. The effect of avidin-biotin interactions in detection systems for in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 1992. Vol. 40, no. 1, p. 135–141.

SU, Dan, CHEN, Lei, SUN, Jianying, ZHANG, Luyue, GAO, Runfei, LI, Qiang, HAN, Yonghua y LI, Zongyun. Comparative chromosomal localization of 45S and 5S rDNA sites in 76 purple-fleshed sweet potato cultivars. *Plants*. 2020. Vol. 9, no. 7, p. 865.

TAYLOR, E. W., 1965. The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H^3-colchicine. *The journal of cell biology*. 1965. Vol. 25, p. SUPPL:145-60.

TREVISANI, Nicole, MELO, Rita Carolina de, PIERRE, Patrícia Maria Oliveira, COLLI, Mauro Porto, COIMBRA, Jefferson Luís Meirelles y GUIDOLIN, Altamir Frederico. Ploidy and DNA content of cape gooseberry populations grown in southern Brazil. *Caryologia; giornale di citologia, citosistematica, e citogenética*. 2018. Vol. 71, no. 4, p. 414–419.

URDAMPILLETA, Juan D., CHIARINI, Franco, STIEFKENS, Laura y BERNARDELLO, Gabriel. Chromosomal differentiation of Tribe Cestreae (Solanaceae) by analyses of 18-5.8-26S and 5S rDNA distribution. *Plant Systematics and Evolution*. 2014. Vol. 301, no. 5, p. 1325–1334.

VAILLANT, Isabelle, TUTOIS, Sylvie, CUVILLIER, Claudine, SCHUBERT, Ingo y TOURMENTE, Sylvette,. Regulation of *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant & cell physiology*. 2007. Vol. 48, no. 5, p. 745–752.

VITALES, Daniel, D'AMBROSIO, Ugo, GÁLVEZ, Francisco, KOVAŘÍK, Aleš y GARCIA, Sònia. Third release of the plant rDNA database with updated content and information on telomere composition and sequenced plant genomes. *Plant Systematics and Evolution*. 2017. Vol. 303, no. 8, p. 1115–1121.

VOLKOV, R. A., ZANKE, C., PANCHUK, I. I. y HEMLEBEN, V. Molecular evolution of 5S rDNA of Solanum species (sect. Petota): application for molecular phylogeny and breeding. *Theoretical and applied genetics*. 2001. Vol. 103, no. 8, p. 1273–1282.

WAMINAL, Nomar Espinosa, PELLERIN, Remnyl Joyce, KIM, Nam-Soo, JAYAKODI, Murukarthick, PARK, Jee Young, YANG, Tae-Jin y KIM, Hyun Hee. Rapid and efficient FISH using pre-labeled oligomer probes. *Scientific reports*. 2018. Vol. 8, no. 1.

WATTERS, Amanda D., STACEY, Michael W. y BARTLETT, John. A modified nick translation method used with FISH that produces reliable results with archival tissue sections. *Molecular biotechnology*. 2002. Vol. 20, no. 3, p. 257–260.

WEBER, David. Nullisomic analysis of nucleolar formation in Zea Mays. *Canadian journal of genetics and cytology*. 1978. Vol. 20, no. 1, p. 97–100.

WILKIE, A. O., HIGGS, D. R., RACK, K. A., BUCKLE, V. J., SPURR, N. K., FISCHEL-GHODSIAN, N., CECCHERINI, I., BROWN, W. R. y HARRIS, P. C. Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. Cell. 1991. Vol. 64, no. 3, p. 595–606.

WILSON, Daniel N. y DOUDNA CATE, Jamie H. The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012. Vol. 4, no. 5, p. a011536–a011536.

YAGI, Kouhei, PAWEŁKOWICZ, Magdalena, OSIPOWSKI, Paweł, SIEDLECKA, Ewa, PRZYBECKI, Zbigniew, TAGASHIRA, Norikazu, HOSHI, Yoshikazu, MALEPSZY, Stefan y PLĄDER, Wojciech. Molecular cytogenetic analysis of Cucumis wild species distributed in southern Africa: Physical mapping of 5S and 45S rDNA with DAPI. *Cytogenetic and genome research*. 2015. Vol. 146, no. 1, p. 80–87.

YOUN-KYU, Park, KIM, Byung-Dong, KIM, Byung-Soo, ARMSTRONG, Kenneth C. y KIM, Nam-Soo. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of the 5S rRNA and 18S-26S rRNA gene families in five different species in Capsicum. *Genes & genetic* systems. 1999. Vol. 74, no. 4, p. 149–157.

ZOLAN, M. E. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological reviews*. 1995. Vol. 59, no. 4, p. 686–698.