

Citogenética de genotipos de uchuva, *Physalis peruviana* L., y *Physalis floridana* Rydb., con respuesta diferencial a *Fusarium oxysporum*

Cytogenetics of *Physalis peruviana* L. and *Physalis floridana* Rydb. genotypes with differential response to *Fusarium oxysporum*

Sara A. Liberato G.¹, Erika Sánchez-Betancourt², Jorge H. Argüelles C.³,
Carolina González A.⁴, Víctor M. Núñez Z.⁵, Luz S. Barrero M.⁶

¹ Bióloga. Corpoica. Mosquera, Cundinamarca. sliberato@corpoica.org.co

² Bióloga. Corpoica. Mosquera, Cundinamarca. esanchez@corpoica.org.co

³ MSc. Estadística. Corpoica. Mosquera, Cundinamarca. jarguelles@corpoica.org.co

⁴ PhD. Biología. Corpoica. Mosquera, Cundinamarca. cgonzaleza@corpoica.org.co

⁵ MSc. Genética y Fitomejoramiento. Corpoica. Mosquera, Cundinamarca. vnunez@corpoica.org.co

⁶ PhD. Genética Vegetal. Corpoica. Mosquera, Cundinamarca. lbarrero@corpoica.org.co

Fecha de recepción: 26/09/2013

Fecha de aceptación: 28/01/2014

ABSTRACT

Vascular wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* is considered the main constraint of cape gooseberry, *Physalis peruviana*, production in Colombia. *P. peruviana* and *P. floridana* genotypes with differential resistance responses against *F. oxysporum* have been identified previously. In the present study, the genotypes were evaluated in order to complement the knowledge of cytogenetics diversity in *Physalis* and to design hybridization strategies to support breeding of cape gooseberry crop. The chromosome number in mitotic dividing cells from root-tips of tissue culture plantlets was determined, from which the average mitotic hour was estimated at 12:00 hours for *P. peruviana* and 10:00 for *P. floridana*. Chromosomic complements of $2n = 4x = 48$ and $2n = 2x = 24$ were found for each one of the two species. Additionally, flow cytometry analyses detected variation within *P. peruviana* with a nuclear DNA content of 2.33 pg for the $2n = 24$ genotype and variations ranged from 5.77 to 8.12 pg for $2n = 48$ genotypes. In *P. floridana* DNA content was 2.29 pg in the $2n = 24$ genotype and 4.03 pg in the $2n = 48$ genotype. There was a significant effect ($\alpha = 0.01$) of the number of chromosomes on nuclear DNA content for the two species.

Key words: flow cytometry, chromosome counting, karyotype.

RESUMEN

El marchitamiento vascular ocasionado por el hongo *Fusarium oxysporum* se considera el principal limitante en la producción de uchuva (*Physalis peruviana*) en Colombia. Se han identificado genotipos de *P. peruviana* y la especie relacionada *P. floridana* con diferentes niveles de reacción a *F. oxysporum*. En el presente estudio, se evaluaron los genotipos con el fin de complementar el conocimiento de la diversidad citogenética en *Physalis* y el diseño de estrategias de hibridación como apoyo al mejoramiento del cultivo de la uchuva. Se determinó el número de cromosomas en células en división mitótica de ápices radicales de plantas cultivadas *in vitro*, para lo cual se estimó como hora mitótica promedio las 12:00 para *P. peruviana*, y las 10:00 para *P. floridana*. Se encontraron dotaciones cromosómicas de $2n = 4x = 48$ y $2n = 2x = 24$ para cada una de las dos especies. Adicionalmente, se realizó un análisis por citometría de flujo, en el cual se detectó variación en el contenido de ADN nuclear en *P. peruviana* con 2,33 pg para el genotipo $2n = 24$ y entre 5,77 y 8,12 pg para los genotipos $2n = 48$. En *P. floridana* el contenido de ADN fue 2,29 pg para el genotipo con número cromosómico $2n = 24$ y 4,03 pg para el genotipo $2n = 48$. Se encontró un efecto significativo ($\alpha = 0,01$) del número de cromosomas sobre el contenido de ADN nuclear para las dos especies.

Palabras claves: cariotipo, citometría de flujo, conteo cromosómico.

INTRODUCCIÓN

La uchuva (*P. peruviana* L.), fruta silvestre y tradicionalmente de producción artesanal, en años recientes ha tenido gran acogida tanto en el mercado local como internacional, generando aumento en su demanda y desarrollo como cultivo comercial. En la actualidad constituye uno de los principales productos frutícolas, representando un valor de US\$ 27,6 millones en exportaciones en 2013 (Agronet, 2014). Su cultivo presenta grandes ventajas competitivas para Colombia, que como país tropical puede garantizar su producción y suministro al mercado internacional (Cotes *et al.*, 2012).

A pesar de su gran potencial genético, existen limitaciones importantes respecto a su desarrollo tecnológico, asociado con la nula oferta de materiales mejorados para suplir el sector. Uno de los principales limitantes de su producción es el marchitamiento vascular causado por el hongo *Fusarium oxysporum* que ha generado desplazamiento de zonas productoras y pérdidas de 40% a 100% (González y Barrero, 2011). Como contribución a la superación de esta limitante, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), en asociación con otras instituciones nacionales, inició la evaluación de resistencia al aislamiento altamente patógeno MAP5 de *F. oxysporum* de una colección de trabajo de uchuva y especies relacionadas, y se encontraron genotipos con reacciones diferenciales (González y Barrero, 2011).

El país también ha avanzado en el conocimiento de la variabilidad genética de la uchuva, incluyendo la caracterización de germoplasma a escala morfo-agronómica para atributos vegetativos y de fruto (Trillos *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2012) y molecular (Bonilla *et al.*, 2008; Simbaqueba *et al.*, 2011; Garzón *et al.*, 2012). En citogenética, el conocimiento es todavía escaso; se destacan los estudios de Rodríguez y Bueno (2006) y Lagos (2006), quienes reportan variación en el número de cromosomas en algunos ecotipos de la especie, desde $2n = 24$ hasta $2n = 48$ con un número básico probable de $X = 12$.

Los materiales con reacción diferencial a *F. oxysporum* que incluyen genotipos de *P. peruviana* y la especie relacionada *P. floridana* aún no han sido caracterizados mediante citogenética. Esta puede complementar el conocimiento de la diversidad y contribuir al diseño de estrategias de cruzamientos para la generación de nuevos

cultivares. En el presente estudio se propuso conocer la variabilidad citogenética de algunos de estos genotipos mediante las técnicas convencionales de conteo cromosómico y citometría de flujo, como contribución a futuros esquemas de mejoramiento genético del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudió el cariotipo y contenido de ADN nuclear de once genotipos de *P. peruviana* y *P. floridana* (tabla 1) en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, del Centro de Biotecnología y Bioindustria –CBB–, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, sede Tibaitatá, ubicado en el km 14 vía Bogotá-Mosquera, Cundinamarca. Los genotipos fueron mantenidos en condiciones de cultivo *in vitro*, con fotoperiodo de 16 horas, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con nitratos a la mitad. Los genotipos provenían de accesiones con reacción diferencial a *F. oxysporum* cepa MAP5 en condiciones de invernadero (Pulido, 2010, resumido en González y Barrero, 2011).

Determinación de números cromosómicos y obtención de cariotipos

Con el fin de lograr metafases de buena calidad para el conteo cromosómico, inicialmente se estimó la hora mitótica siguiendo la metodología planteada por Rodríguez y Bueno (2006). Para esto, se colectaron por especie tres ápices radicales secundarios de 1 a 2 cm de longitud, procedentes de plantas con aproximadamente 2 semanas de cultivo *in vitro*, a intervalos de una hora durante 24 horas, con dos repeticiones en el tiempo. Los ápices se fijaron en Carnoy (alcohol al 96% y ácido acético glacial 3:1), se transfirieron a etanol al 70% a 4 °C y se sometieron a hidrólisis, coloración y aplastamiento, como se describe más adelante. Por cada montaje, se analizaron mil células, contando el número correspondiente a cada una de las fases del ciclo celular: interfase, profase, metafase, anafase y telofase. Luego, se determinó el índice de fases parciales (IF), dividiendo el número de células de cada fase entre el número total y multiplicando por 100; posteriormente, se determinó el índice mitótico parcial (IM), con base en la sumatoria de los índices de fases parciales. La hora mitótica correspondió a la de mayor índice mitótico (IM), es decir, aquella con mayor número de células en división activa en el ápice. La relación existente entre

Tabla 1. Información citogenética de genotipos de *P. peruviana* y *P. floridana* utilizados en el estudio

Nombre científico	Código accesión - Número genotipo	Procedencia	Respuesta de resistencia a <i>F. oxysporum</i> ²	Número cromosómico / ploidía ³	Número y tipo de morfología cromosómica ⁴	Contenido medio de ADN (pg) 2C/4C ⁵	Tamaño genoma (Mb) 1C ⁶
<i>P. peruviana</i>	09u047-1 ^{UNB}	Colombia (Boyacá)	Poco susceptible	48 / 2n = 4x	m = 12; sm = 7; st = 4; t = 1	8,12 ^a	1985,34
<i>P. peruviana</i>	09u216-6 ^{UN}	Colombia (Nariño)	Moderadamente susceptible	48 / 2n = 4x	m = 10; sm = 9; st = 4; t = 1	7,72 ^a	1887,54
	09u216-3 ^{UN}						
<i>P. peruviana</i>	09u274-1 ^N	Colombia (Cundinamarca)	Susceptible	48 / 2n = 4x	m = 9; sm = 10; st = 5; t = 0	5,77 ^b	1410,77
<i>P. peruviana</i>	09u279-1 ^C	Colombia (Nariño)	Resistente	48 / 2n = 4x	m = 10; sm = 7; st = 5; t = 2	8,04 ^a	1965,78
<i>P. peruviana</i>	09u288-2 ^{USDA}	Sur África	Susceptible	48 / 2n = 4x	m = 8; sm = 8; st = 7; t = 1	8,04 ^a	1965,78
<i>P. peruviana</i>	09u289-1 ^{USDA}	Polonia	Altamente susceptible	24 / 2n = 2x	ND	2,33 ^d	1139,37
<i>P. peruviana</i>	09u290-1 ^{USDA}	India	Altamente susceptible	48 / 2n = 4x	m = 13; sm = 4; st = 5; t = 2	7,90 ^a	1931,55
<i>P. floridana</i>	09u139-1 ^C	Reino Unido	Resistente	48 / 2n = 4x	m = 2; sm = 15; st = 7; t = 0	4,03 ^c	985,33
	09u139-2 ^C						
<i>P. floridana</i>	09u141-1 ^C	Francia	Altamente susceptible	24 / 2n = 2x	m = 0; sm = 9; st = 3; t = 0	2,29 ^d	1119,81
TOTAL	11						

¹ Procedentes de colecciones de Universidad Nacional sede Bogotá (^{UNB}), Universidad de Nariño (^{UN}), Novacampo (^N), Corpoica (^C), Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (^{USDA}).

² Respuesta por accesión en condiciones de invernadero de acuerdo con escala de Pulido (2010).

³ Asumiendo número básico X = 12 en *P. peruviana* (Menzel, 1951; Lagos, 2006) y en *P. floridana* (según citometría de flujo).

⁴ m = metacéntricos, sm = submetacéntricos, st = subtlocéntricos, t = telocéntricos.

⁵ Estimado por citometría de flujo; ^{a, b, c, d} Medias con una letra en común no presentan diferencias estadísticas significativas, según prueba Tukey ($\alpha = 0,05$).

⁶ 1pg (picogramo) = 978 Mb (megabases) (Dolezel *et al.*, 2007).

ND = no determinado.

los índices mitóticos y la hora de colecta de las raíces en el lapso de 24 horas se determinó mediante análisis de regresión, utilizando el paquete SAS® (Statistical Analysis System) versión 9.1, mediante el modelo general lineal (GLM). Los modelos de regresión propuestos fueron de tipo lineal, cuadrático, cúbico y exponencial; y se seleccionaron los significativos ($\alpha \leq 0,05$) en la prueba de *t*.

Una vez determinada la hora mitótica, se realizó conteo cromosómico en *P. peruviana* y *P. floridana* mediante observación de cromosomas en punta de raíz de genotipos procedentes de cultivo *in vitro*, con algunas modificaciones (Rodríguez y Bueno, 2006). Las raíces de 1 a 2 cm de longitud fueron pretratadas en una solución de colchicina al 0,25% diluida en dimetil-sulfoxido (DMSO) al 2% durante 3 horas. El tejido fue fijado en solución Carnoy (alcohol 96% + ácido acético glacial en proporción 3:1) durante 15 horas y sujeto a hidrólisis ácida con HCl 1N durante 25 min a temperatura ambiente. Luego, las raíces se sumergieron en agua a 37 °C, la cual actúa como solución hipotónica que permite mayor dispersión de los cromosomas. El tejido se coloreó con orceína propiónica al 2% durante 15 minutos, y finalmente se realizó el aplastamiento.

Para la determinación del número cromosómico, se contaron entre 25 y 30 placas metafásicas de buena calidad y dispersión de acuerdo con Mejía (2009). La morfología de los cromosomas se identificó siguiendo las pautas propuestas por Levan *et al.* (1964). Se tomaron fotografías de las cinco mejores metafases, utilizando un microscopio óptico Olympus BX 41 y una cámara digital Sony DSC – W120. Con el programa Adobe Photoshop CS5 Portable se corroboró el número de cromosomas, se estableció la morfología de los mismos y se elaboraron los cariotipos por acesión.

Determinación del contenido de ADN nuclear

Se analizaron 10 genotipos por citometría de flujo; de estos, ocho correspondieron a *P. peruviana* y dos a *P. floridana* (tabla 1). Para este análisis se utilizó tejido foliar joven de plantas *in vitro*, el cual se cortó finamente y se embebió en buffer de extracción de núcleos descrito en Dolezel *et al.* (2007). Luego, el homogenizado se filtró en una malla de nailon y los núcleos aislados fueron teñidos con colorante fluorescente específico para ADN (Dolezel *et al.*, 2007). Los núcleos se analizaron en un citómetro Partec *Ploidy Analyzer* (PA).

La cantidad relativa de ADN se midió utilizando como control externo glóbulos rojos de trucha, cuya masa nuclear contiene 5,05 picogramos (pg) (Fukui y Nakayama, 1996). La lectura de los núcleos se efectuó en fase G1 del ciclo celular considerando que para diploides hay dos copias del genoma y se expresa con el valor 2C (Dolezel *et al.*, 2007); en el caso de poliploides, se expresa con el valor correspondiente al número de copias del genoma. Se realizaron tres réplicas por cada una de las accesiones. Los resultados se presentaron en un histograma que expresa la distribución de los núcleos de acuerdo con la intensidad de fluorescencia, la cual es proporcional al contenido de ADN. Para establecer el efecto de los genotipos sobre el contenido de ADN, se realizó un análisis de varianza (anova), complementado con una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$). Con los datos obtenidos a partir de conteos celulares y citometría de flujo, se ajustaron modelos de regresión, utilizando el mismo procedimiento del software SAS ya mencionado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Números cromosómicos y cariotipos

La hora mitótica se pudo establecer con base en los modelos de regresión ajustados para cada una de las dos especies, que corresponden a las siguientes ecuaciones:

P. peruviana

$$IM = -39,953 + 7,754 H - 0,322 H^2 \quad (R^2 = 23,3, p < 0,0001)$$

P. floridana

$$IM = -113,716 + 32,150 H - 2,805 H^2 + 0,0788 H^3 \quad (R^2 = 32,5, p < 0,0002)$$

Donde:

IM = índice mitótico

H = hora del día

Los coeficientes de determinación fueron bajos, debido a que se presentó alta variabilidad en las observaciones; sin embargo, se pudo determinar mediante el modelo de regresión, un efecto significativo de la hora sobre el índice mitótico. Así, la hora mitótica correspondió a las 12:00 para *P. peruviana* y las 10:00, para *P. floridana* (figura 1).

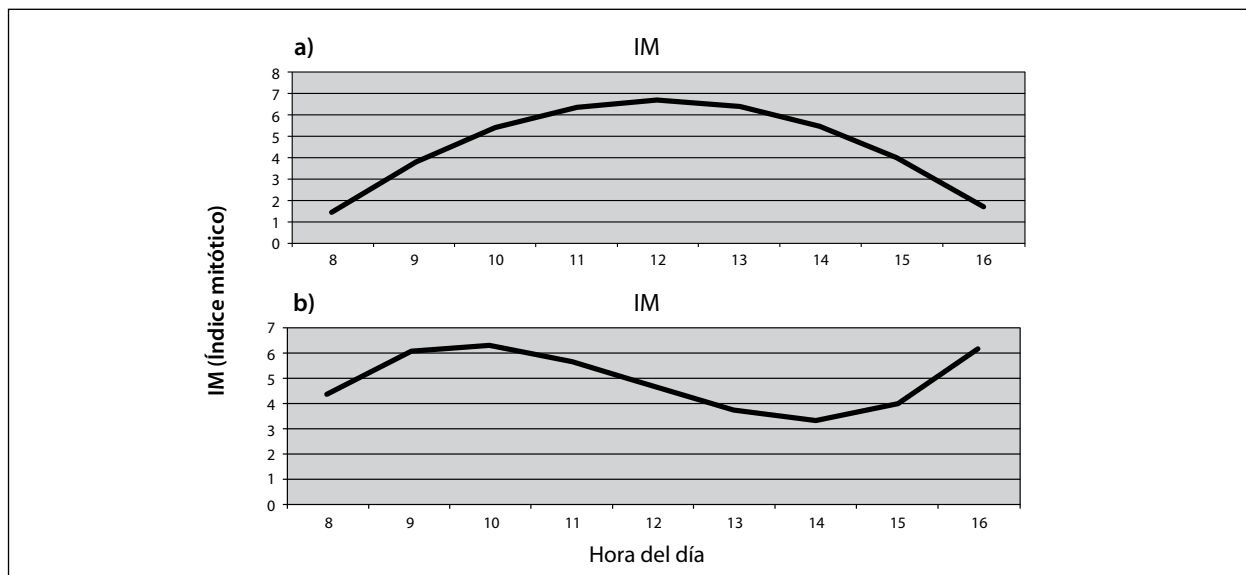


Figura 1. Modelos de regresión ajustados para A. *P. peruviana* $R^2 = 23,3$ y B. *P. floridana* $R^2 = 32,5$, mostrando la variación del IM (índice mitótico) en función de la hora del día

Las muestras de raíz fueron entonces colectadas en el tiempo de hora mitótica estimado para determinación de número cromosómico y cariotipo. En siete de los ocho genotipos evaluados de *P. peruviana*, el número cromosómico encontrado fue $2n = 48$, dato que coincide con lo registrado por Vilmorin y Simonet (1928), Menzel (1951), Gupta y Roy (1985), Moriconi *et al.* (1990) y Ganapathi *et al.* (1991); mientras que el genotipo 09U289-1 presentó 24 cromosomas, situación que coincide con la condición diploide reportada por Yamamoto y Sakai (1932) (tabla 1).

En Colombia, Lagos (2006) reporta números cromosómicos de $2n = 24$, 36 y 48 como característicos de *P. peruviana* y registra casos de mixoploidía, y concluye que la especie está definiendo su complemento cromosómico. Rodríguez y Bueno (2006) también reportan diferentes números cromosómicos de acuerdo con el ecotipo; de esta forma, para el ecotipo Colombia la dotación cromosómica es de $2n = 32$, para el Kenia de $2n = 48$ y para el Silvestre, de $2n = 24$. En el presente estudio, según los datos de pasaporte, la accesión 09U216 pertenece al ecotipo Colombia, lo cual indica variación en el número cromosómico en accesiones de este ecotipo cultivado. Estos resultados sugieren que *P. peruviana* está definiendo su complemento cromosómico, en concordancia con Lagos (2006), posiblemente en relación con el hecho de que pasó de ser una especie silvestre a cultivada, sin experimentar un proceso de domesticación como la especie relacionada *Solanum*

lycopersicum (Cong *et al.*, 2008). Dada la reproducción mixta de *P. peruviana* con más de 50% de alogamia (Lagos *et al.*, 2008), se podría, además, suponer la existencia de cruzamientos naturales que podrían haber conducido a la generación de dotaciones cromosómicas variables para la especie, incluso en materiales del mismo ecotipo.

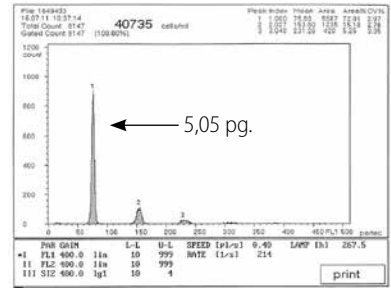
Los cariotipos representativos de genotipos de *P. peruviana* y *P. floridana* están conformados principalmente por cromosomas biarmados, metacéntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos, y en menor proporción por cromosomas telocéntricos (figura 2) cuyo número para cada morfología varía dentro de las dos especies y entre ellas (tabla 1). En los genotipos 09U047-1, 09U216-3, 09U216-6, 09U279-1 y 09U288-2 fue posible diferenciar la presencia de satélites en cinco pares de cromosomas (ver ejemplo de 09U047-1 en figura 2); esta observación también fue hecha por Menzel (1951), confirmando así la presencia de satélites en el complemento cromosómico de *P. peruviana*. En *P. floridana* se obtuvieron $2n = 24$ para el genotipo 09U141-1, dato que coincide con los dos estudios citogenéticos existentes bajo su sinónimo *P. pubescens* realizados por Menzel (1951) y Vilmorin y Simonet (1932). Por otra parte, el genotipo 09U139-1 presentó un número cromosómico de $2n = 48$ que indica la existencia de una segunda dotación cromosómica para esta especie.

Cromosomas en metafase

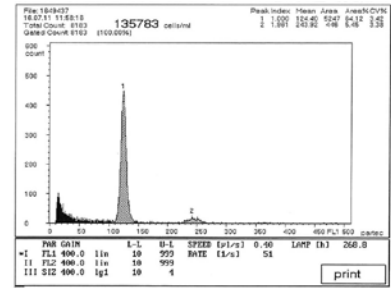
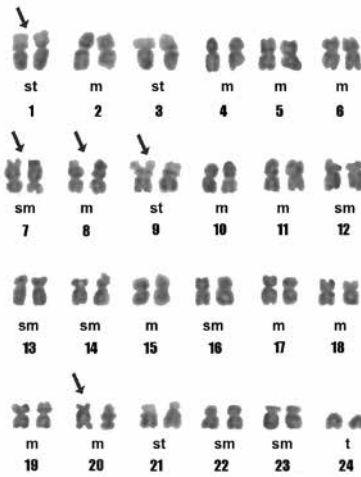
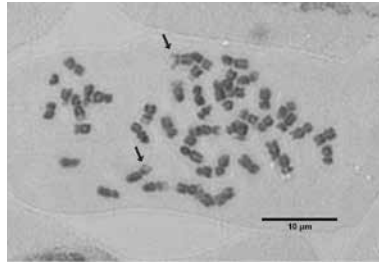
Cariotipo *

Histograma CF**

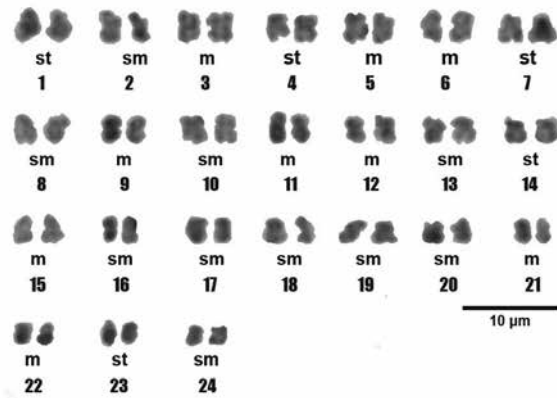
Control



P. peruviana 09U047-1



P. peruviana 09U274-1

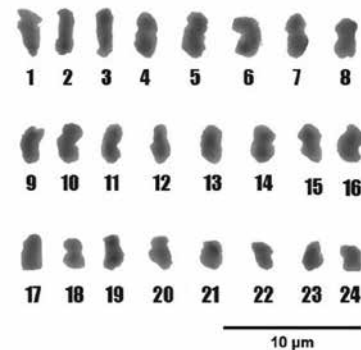
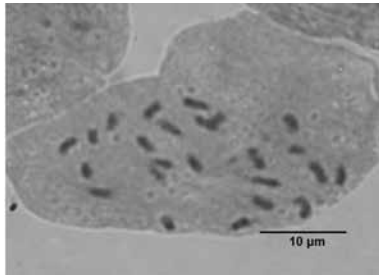


10 µm

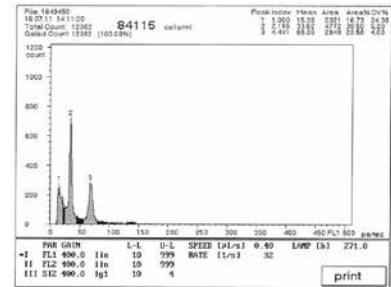
p. 51-61

56

P. peruviana 09U289-1



10 µm

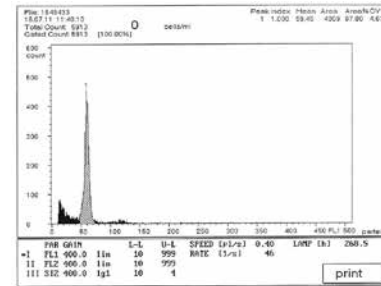
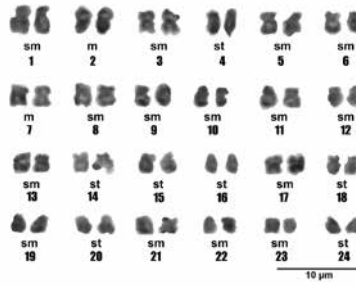
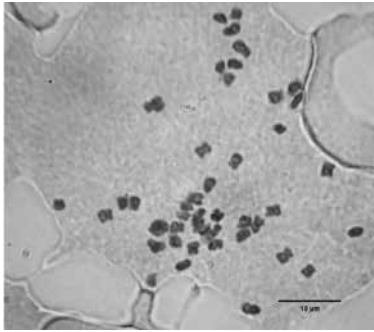


Cromosomas en metafase

Cariotipo *

Histograma CF**

P. floridana 09U139-1



P. floridana 09U141-1

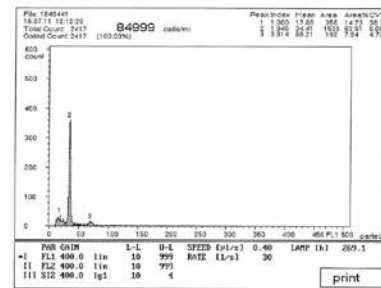
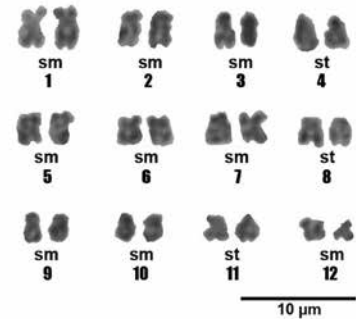
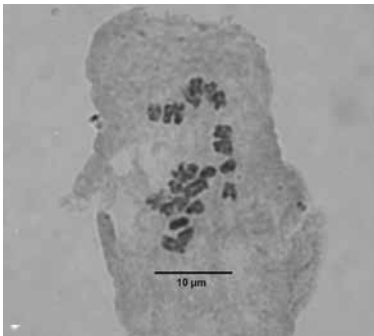


Figura 2. Cromosomas en metafase, cariotipo (escala de 10 μ m) y CF = Citometría de flujo representativos de genotipos de *P. peruviana* y *P. floridana*

*Las flechas indican la presencia de satélites en cinco pares de cromosomas (09U047-1). m = metacéntricos, sm = submetacéntricos, st = subtelocéntricos, t = telocéntricos.

**Histogramas representativos de CF; se muestra el control diploide con un pico máximo que corresponde a la etapa G1 del ciclo celular (canal 76) equivalente a un contenido de ADN nuclear de 5,05 pg; el segundo pico (canal 154) corresponde a la etapa G2. El contenido de ADN nuclear de los genotipos se estimó con el cociente entre el número de canal de la muestra y el del control multiplicado por 5,05 pg (tabla 1).

Contenido de ADN nuclear y nivel de ploidía

En este estudio se reporta por primera vez el contenido de ADN nuclear en *P. peruviana* y *P. floridana* analizado por citometría de flujo. El valor para cualquier tipo de célula blanco se puede cuantificar con relación a un contenido estándar en las células de una especie de referencia y en cualquier estado de replicación (Greilhulber *et al.*, 2005); asimismo, los estándares pueden ser corridos secuencialmente en el citómetro o simultáneamente con la muestra (Johnson *et al.*, 1987). En este estudio se usó como control glóbulos rojos de trucha, los cuales han sido empleados rutinariamente para determinar tamaño del genoma y conocer el nivel de ploidía tanto en plantas como en animales (Galbraith *et al.*, 1983; Aramuganathan y Earle, 1991; Bennett y Leitch, 1995; Thompson *et al.*, 1997; Dolezel *et al.*,

1998; Dolezel *et al.*, 2003). Su uso se remonta al reporte de Tiersch *et al.* (1989) en el que se da a conocer el contenido de ADN de estos núcleos, y es ampliamente usado ya que en la etapa de replicación el contenido de ADN en los núcleos es en gran medida invariable (Heslop-Harrison y Schwarzscher, 1996).

Los genotipos de *P. peruviana* presentaron un rango de 2,33 a 8,12 pg de ADN nuclear, mientras los dos genotipos de *P. floridana* presentaron 2,29 y 4,03 pg (tabla 1). El número cromosómico más frecuente en la familia Solanaceae es $X = 12$ (Pozzobon *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2010), lo cual coincide con los estudios de Menzel para el género *Physalis* (1951). Considerando esto, los genotipos de *P. peruviana* $2n = 48$ corresponderían a materiales tetraploides, lo cual concuerda con su contenido de ADN.

Por otra parte, el genotipo *P. peruviana* 09U289-1 se consideraría diploide ($2n = 24$); sin embargo, no fue posible asignar cromosomas homólogos posiblemente por la baja resolución obtenida para este cariotipo (figura 2). Este complemento cromosómico, sin embargo, no concuerda con su bajo contenido de ADN (2,33 pg), el cual presenta una reducción de 2,5 a 3,5 veces en comparación con los demás genotipos de *P. peruviana* analizados (tabla 1 y figura 2). 09U289-1 podría ser un haploide natural en *P. peruviana*, asumiendo que la dotación cromosómica $2n = 24$ representa el número gamético de la especie, condición que deberá ser confirmada mediante estudios de cromosomas en polen. Germaná (2009) y Bhojwani y Dantu (2010) señalan que los haploides son sexualmente estériles, por tanto, es necesario el doblamiento de sus cromosomas para lograr una planta fértil generando así doble haploides o diploides homocigotos (DH), que representan dos ventajas en el mejoramiento de cultivos. La primera, el complemento completo del genoma es expresado a escala fenotípica y la segunda, se reduce el tiempo necesario para producir líneas homocigóticas en comparación con el cruzamiento tradicional. Otra posibilidad es que el genotipo 09U289-1, procedente del repositorio USDA de los Estados Unidos, se encuentre mal clasificado como *P. peruviana*, por lo cual se hacen necesarios estudios taxonómicos que corroboren su clasificación.

El contenido de ADN nuclear en los genotipos en estudio presentó diferencias estadísticas significativas ($\alpha < 0,001$), de acuerdo con el Anova, por lo que se procedió a realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha < 0,05$). Esta prueba agrupó los genotipos de *P. peruviana* en tres grupos mutuamente excluyentes, identificados por las letras a, b y d (tabla 1). En el caso de los genotipos 09U289-1 y 09U274-1, su contenido medio de ADN mostró diferencias estadísticas significativas con todos los demás genotipos de la especie. En 09U289-1, los resultados se relacionaron con su menor número cromosómico ($2n = 24$) y en 09U274-1, con número cromosómico $2n = 48$, puede relacionarse a un tamaño cromosómico relativamente menor en comparación con los demás genotipos (figura 2). En *P. floridana* la prueba Tukey mostró diferencias estadísticas significativas entre 09U141-1 y 09U139-1, en relación con complementos cromosómicos distintos de $2n = 24$ y $2n = 48$, respectivamente.

Para determinar el efecto del número de cromosomas sobre el contenido de ADN, se ajustó un modelo de regresión lineal simple para cada especie, el cual se expone a continuación:

P. peruviana

ADN = $-3,303 + 0,235$ número de cromosomas,
 $R^2 = 98,6\%$

P. floridana

ADN = $-0,557 + 0,072$ número de cromosomas,
 $R^2 = 99,7\%$

Los dos coeficientes del modelo de regresión para las dos especies fueron estadísticamente diferentes de 0 ($\alpha = 0,01$, prueba de t). Lo anterior permite concluir que hay un efecto significativo del número de cromosomas sobre el contenido de ADN en el núcleo. Para el caso de *P. floridana*, por cada cromosoma el contenido de ADN aumenta 0,072 pg; mientras que en *P. peruviana* cada cromosoma genera un aumento en el contenido de ADN de 0,235 pg. En esta última especie no se consideró el genotipo 09U274-1 para el ajuste del modelo, debido a que se comportó como dato atípico y afectaba la normalidad en la distribución de los residuales del modelo ajustado.

La variación en el contenido de ADN puede ser debida a fenómenos de hibridación, o también por pérdida o ganancia de secuencias de ADN repetitivo según lo expuesto por Price (1988), situación que puede asociarse con la adaptación a condiciones ambientales cambiantes (Cavallini y Natali, 1991), lo cual se relaciona con la diversa procedencia del material vegetal (tabla 1) y con climas y ambientes propios de cada región. Poggio y Naranjo (2004) también asocian este tipo de variaciones con el estrés que se deriva de prácticas de cultivo de tejidos.

Basados en el contenido de ADN, es posible realizar inferencias en relación con el tamaño del genoma. Así, al compararlo con otros miembros de la familia de las Solanáceas, el tamaño del genoma de la uchuva es mayor. Por ejemplo, al comparar con papa (*Solanum tuberosum*), cuyo tamaño de genoma es 844 Mb (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011) y 0,86 pg, *P. peruviana* sería mayor de 2,7 a 9,4 veces, considerando el rango de contenido de ADN (de 2,33 a 8,12 pg, tabla 1). De forma similar, en comparación con el tomate (*Solanum lycopersicum*), cuyo contenido de ADN (Arumuganathan y Earle, 1991; Dolezel *et al.*, 2007) y tamaño de genoma (The Tomato Genome Sequencing Consortium, 2012) se estima en 0,9 pg y 900 Mb, el genoma de la uchuva sería mayor de 2,5 a 9 veces.

Los resultados de citogenética pueden predecir el éxito de cruzamientos tanto intra como interespecíficos en

las accesiones estudiadas, aportando conocimiento para el diseño de esquemas de mejoramiento en la especie. Así, las accesiones más similares en su complemento cromosómico en cuanto a forma, tamaño y número de cromosomas o contenido de ADN podrían ser más exitosas en la producción de progenie viable, tal como lo señalan Menzel (1951), Ortiz *et al.* (1998) y Serrato *et al.* (2000). De esta manera, un comportamiento exitoso podría predecirse para cruces entre genotipos de diferentes especies como el 09U289-1 de *P. peruviana* y el 09U141-1 de *P. floridana*, los cuales no mostraron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para el contenido de ADN; o entre los genotipos de *P. peruviana* (09U047-1, 09U216-6, 09U216-3, 09U279-1, 09U288-2, 09U290-1), los cuales no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí. Considerando únicamente similitudes en el número cromosómico, es probable que estos últimos genotipos, así como 09U274-1, puedan producir progenie viable en cruces con el genotipo 09U139-1 de *P. floridana* (tabla 1).

Evidencia de lo anterior se encuentra en el trabajo de Berdugo (2012), quien realizó cruzamientos entre genotipos de *P. peruviana* y *P. floridana* con reacción diferencial a *F. oxysporum* y número cromosómico similar ($2n = 48$). En el estudio se encontró un 100% de viabilidad en cruces intraespecíficos entre genotipos procedentes de las accesiones 09U047, 09U279 y 09U216 (subconjunto a) y 09U274 (subconjunto b) de *P. peruviana* y 50% en cruces interespecíficos entre genotipos de las accesiones 09U216 y 09U274 de *P. peruviana* con 09U139 (subconjunto c) de *P. floridana*, siendo viables sólo cuando el progenitor femenino fue *P. floridana*.

Es igualmente probable que exista mayor incompatibilidad entre genotipos con diferencias cromosómicas significativas y, por lo tanto, no se dé la fecundación o se generen abortos provocados por un alto grado de irregularidad en la meiosis; situación reportada por Menzel (1951) en otras especies del género *Physalis*. En las progenies híbridas entre parentales con diferente número cromosómico también se pueden encontrar niveles de ploidía inesperados, inestabilidad genómica o número impar de cromosomas, que podrían darse por casos de gametos no reducidos, apomixis, y quimeras, lo que produciría infertilidad y bajos niveles de productividad de estos cultivos (Serrato *et al.*, 2000; Laguado, 2007).

El estudio permitió complementar el conocimiento de la diversidad citogenética de germoplasma de *P. peruviana* y la especie relacionada *P. floridana*, previamente identificadas por presentar reacción diferencial al patógeno más limitante de la producción de uchuva, *Fusarium oxysporum*. Se determinó por primera vez el contenido de ADN para las dos especies de *Physalis*, encontrándose que *P. peruviana* posee tamaños de genoma superiores en comparación con especies de la misma familia -tomate y papa-, lo cual debe ser considerado para estudios genéticos y genómicos de la especie. Al mismo tiempo, el estudio permitió diseñar exitosamente estrategias de hibridación dentro y entre genotipos de las dos especies, tal como se demostró con accesiones similares por Berdugo (2012). Así, los resultados permiten coleccionar que este conocimiento es muy útil en la selección de parentales como apoyo a esquemas de mejoramiento del cultivo.

CONCLUSIONES

Se determinó variabilidad citogenética de genotipos de *Physalis peruviana* y la especie relacionada *P. floridana*, encontrándose complementos cromosómicos de $2n = 24$ y $2n = 48$; este último reportado por primera vez para *P. floridana*. Asimismo, en el estudio se analizó por primera vez en las dos especies el contenido de ADN mediante citometría de flujo y se encontró alta variabilidad en concordancia con el conteo cromosómico. Lo anterior permitió plantear el diseño de estrategias de hibridación dentro y entre genotipos de las dos especies, de interés en cuanto a su reacción diferencial a *F. oxysporum*. Esta última debe ser estudiada en función de otros ambientes y años para determinar resistencia. El estudio aporta conocimiento sobre la citogenética del cultivo como contribución a futuros esquemas de mejoramiento genético de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Edgar Jiménez por su asistencia técnica en el suministro de material vegetal *in vitro*; a T. Lagos, F. Matallana, M. Chacón y M. Lobo por el suministro de semilla de colecciones de la Universidad de Nariño, Novacampo, Universidad Nacional sede Bogotá y Corpoica.

REFERENCIAS

- Agronet. 2014. En: <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/Verreporte.aspx>; Consulta: marzo de 2014.
- Aramuganathan K, Earle ED. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9(3): 229-241.
- Bennett MD, Leitch I. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113-176.
- Berdugo J. 2012. Generación y caracterización molecular de progenies F1 de *Physalis peruviana* L. y *P. floridana* procedentes del cruce entre genotipos contrastantes por su respuesta de resistencia a *Fusarium oxysporum* (tesis de grado). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Ciencias Biológicas. Tunja, Boyacá.
- Bhojwani S, Dantu P. 2010. Haploid Plants. En: Davey MR, Anthony P. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Wiley - Blackwell. Chichester, p. 61-75.
- Bonilla M, Espinosa K, Posso A, Vásquez H, Muñoz J. 2008. Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. *Acta Agronómica* 57 (2): 109-115.
- Cavallini L, Natali L. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia* 44: 93-107.
- Cong B, Barrero L, Tanksley S. (2008). Regulatory Change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics* 40(6): 800-804.
- Cotes AM, Barrero LS, Rodríguez F, Zuluaga MV, Arévalo H. 2012. Bioprospección para el desarrollo del sector agropecuario de Colombia. Corpoica - Ministerio de Agricultura. Produmedios. Bogotá D.C. Colombia. 195 p.
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51(2): 127-128.
- Dolezel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysak MA, Nardi L, Obermayer R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: interlaboratory comparison. *Ann Bot* 82(suppl A): 17-26.
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2(9):2233-2244.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytophotometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049 - 1051.
- Ganapathi A, Sudhakaran S, Kulothungan S. 1991. The diploid taxon in Indian natural populations of *Physalis* L. and its taxonomic significance. *Cytologia* 56(2):283-288.
- Garzón-Martínez GA, Zhu I, Landsman D, Barrero LS, Mariño-Ramírez L. 2012. The *Physalis peruviana* leaf transcriptome: assembly, annotation and gene model prediction. *BMC Genomics* 13: 151.
- Germaná MA. 2009. Chapter 21 haploids and doubled haploids in fruit trees. En: Touraev A, Forster B, Mohan Jain S. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Netherlands, p. 241-263.
- González CA, Barrero LS. 2011. Estudio de la marchitez vascular de la uchuva para el mejoramiento genético del cultivo. Corpoica, MADR, Novacampo, Cámara de Comercio de Bogotá. Editorial Kimpres, 44 p.
- Greilhuber J, Dolezel J, Lysa M, Bennett M. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome Size' and 'C-Value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255-260.
- Gupta SK, Roy SK. 1985. Radiosensitivity of a diploid and a tetraploid species of *Physalis*. *Genética Agraria* 39(4): 357-366.
- Herrera A, Fischer G, Chacón M. 2012. Evaluación agronómica de materiales de uchuva (*Physalis peruviana* L.) provenientes del centro y nororiente colombiano. *Agronomía Colombiana* 30 (1): 15-24.
- Heslop-Harrison J, Schwarzacher T. 1996. Flow cytometry and chromosome sorting. En Fukui K, Nakayama S, eds. *Plant chromosomes - Laboratory Methods*. New York: CRC Press Inc.
- Johnson OW, Utter FM, Fabinovitch PS. 1987. Interspecies differences in salmonid cellular DNA identified by flow cytometry. *Copeia* 4: 1001-1009.
- Lagos T, Vallejo F, Criollo H, Muñoz J. 2008. Biología reproductiva de la uchuva. *Acta Agronómica* 57(2): 81 - 87.
- Lagos T. 2006. Biología reproductiva, citogenética, diversidad genética y heterosis en parentales de uvilla o uchuva *Physalis peruviana* L. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia, p. 44 - 67.
- Laguado J. 2007. Aplicaciones de la Citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Rev. MVZ Córdoba* 12 (2): 1077-1095.
- Levan A, Freda K, Sandberg A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position of Chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lou Q, Iovene M, Spooner DM, Buell R, Jiang J. 2010. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Chromosoma* 119: 435-442.
- Mejía VI. 2009. Número cromosómico de siete especies del Género *Mimosa* (leguminosa). Universidad Autónoma Metropolitana Seminario de Investigación. En:<http://148.206.53.231/UAMI10209.pdf>; consulta: agosto 2011.
- Menzel MY. 1951. The Cytotaxonomy and Genetics of *Physalis*. *Proceedings of the American Philosophical Society* 95: 132-183.
- Moriconi D, Rush M, Flórez H. 1990. Tomatillo: una cosecha vegetal potencial para Luisiana. *Avances en cosechas nuevas*. Prensa de la Madera, Portland. p. 407-413.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15 (479): 15-19.
- Ortiz R, Ulburghs F, Okoro JU. 1998. Variación estacional de la fertilidad aparente de las manchas y de la producción de polen 2n en plátanos y bananos. *Hortscience* 33(1): 146-148.
- Poggio L, Naranjo C. 2004. Citogenética. En: Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L. *Biotechnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires, Argentina. Ediciones INTA, p 69-79.
- Pozzobon MT, Schifino-Wittmann MT, De Bem Bianchetti L. 2006. Chromosome numbers in wild and semidomesticated *Brazilian Capsicum* L. (Solanaceae) species: do x = 12 and x = 13 represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 259-269.
- Price HJ. 1988. Nuclear DNA variation among higher plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1248 - 1257.
- Pulido VC. 2010. Evaluación de la resistencia y susceptibilidad de genotipos élite de germoplasma de uchuva (*Physalis peruviana* L.) al hongo *Fusarium oxysporum* Schldt. Trabajo de grado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja-Colombia, p.175.
- Rodríguez N, Bueno M. 2006. Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). *Acta Biológica Colombiana* 11(2): 75-85.

- Serrato M, Hernandez M, Savidan Y, Barcenas N. 2000. Determinación de la ploidía en progenies de *Tagetes* spp. mediante citómetro de flujo. *Agrociencia* 34(6): 735-740.
- Simbaqueba J, Sánchez P, Sánchez E, Núñez Zarantes VM, Chacón MI, Barrero LS, Mariño-Ramírez L. 2011. Development and Characterization of Microsatellite Markers for the Cape Gooseberry *Physalis peruviana*. *PLoS one* 6(10): e26719.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189–195.
- The Tomato Genome Sequencing Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.
- Thompson J, Cunningham B, Segraves K, Althoff D, Wagner D. 1997. Plant polyploidy and plant/insect interactions. *The American Naturalist* 150(6):730 – 743.
- Tiersch T, Chandler R, Wachtel S, Elias S. 1989. Reference standards for flow cytometry an application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry* 10:706 – 710.
- Trillos O, Cotes J, Medina C, Lobo M, Navas A. 2008. Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). *Rev. Bras. Frutic* 30(3): 708-715.
- Vilmorin Simonet. 1928. Recherches sur le nombre des chromosomes chez les solanées. *Internatl. Kong. Vererbungswiss, Verhandl* 2: 1520-1536.
- Vilmorin Simonet. 1932. Citado por Menzel 1951. The Cytotaxonomy and Genetics of *Physalis*. *Proc Am Phylos Soc.* 95:132-183.
- Yamamoto K, Sakai K. 1932. On the chromosome number in some Solanaceae. *Jap. J. Genet.* 8:27-33.