

EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA MEDICIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Capsicum annum* L. DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIFAP-ZACATECAS

Acuña-Aguayo, A.L.², Velásquez-Valle, R.¹, Salas-Muñoz, S.¹, Martínez-Salazar, E.² y Reveles-Torres, L.R.^{1*}

¹ Campo Experimental Zacatecas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Apdo. Postal # 18, Calera de V. R., Zacatecas, México. C.P.98500

² Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zac., México. CP. 98000

*Autor de correspondencia: L.R. Reveles-Torres reveles.roberto@inifap.gob.mx

RESUMEN

México, es uno de los centros de domesticación de la especie cultivada *Capsicum annum* que presenta una amplia diversidad genética y distribución, por su importancia económica y agrícola. El estado de Zacatecas ocupa el primer lugar con mayor superficie sembrada. Con la llegada de las sofisticadas técnicas de biología molecular para la determinación de la variabilidad y caracterización genética aplicada a especies animales y vegetales, se establece una nueva perspectiva sobre el estudio de la biodiversidad. Con el presente estudio se inicia el interés de evaluar la diversidad genética del banco de germoplasma de chile del INIFAP Zacatecas, para lo cual en un estudio exploratorio con 24 accesiones, se probaron 10 iniciadores para la generación de polimorfismos, encontrando a cinco de ellos (OPAS-01, OPR-06, OPAA-11, OPA-02, OPAB-08) como polimórficos, los cuales podrían ser en los finalmente generen la separación de grupos y determinen variación genética que correlacione con características agronómicas en estudios siguientes, y con ello hacer uso eficiente del manejo de los recursos genéticos, para los programas de mejoramiento.

Palabras Clave: chile, variación genética, RAPDs, polimorfismo.

ABSTRACT

Mexico is one of the centers of domestication of *Capsicum annum* cultivated species having a wide genetic diversity and distribution for its economic and agricultural importance. The state of Zacatecas ranks first with largest acreage. With the advent of sophisticated molecular biology techniques for the determination of variability and genetic characterization applied to animal and plant species, a new

perspective on the study of biodiversity is established. In this study the value of assessing the genetic diversity of the germplasm bank chili INIFAP Zacatecas starts, for which an exploratory study, 10 primers to generate polymorphisms were tested in 24 accessions, finding five of them (OPAS-01 OPR-06, OPAA-11, OPA-02, OPAB-08) as polymorphic, which could eventually be generated in the separation of groups and identify genetic variation that correlates with agronomic traits on these studies, and thus make use efficient management of genetic resources for breeding programs.

Keywords: chile, genetic variation, RAPD polymorphism.

INTRODUCCION

El género *Capsicum*, comúnmente conocido como chile, pertenece a la familia Solanaceae y es uno de los cultivos originarios de Mesoamérica (Pickersgill *et al.*, 1989). Está conformado por aproximadamente 30 especies, dentro de las cuales se reconocen cinco especies cultivadas, *Capsicum annum* L., *Capsicum. frutescens* L., *Capsicum. chinense* Jackuin., *Capsicum baccatum* L., y *Capsicum pubescens* (Pickersgill, 1983). Este género se distribuye principalmente en las áreas tropical y subtropical de Mesoamérica y otros países del mundo (Pickersgill, 1971).

México, es uno de los centros de domesticación de la especie cultivada *C. annum* que presenta una amplia diversidad genética y distribución, por su importancia económica y agrícola (Pickersgill *et al.*, 1989; Ulloa, 2006). Junto con la calabaza (*Curcubita pepo* L.), el maíz (*Zea mays* L.) y el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el chile ha sido y es base de la alimentación en México. En el año 2010, la FAO reportó que México ocupa el segundo lugar en producción de chile, únicamente superado por China. Los estados de la República Mexicana con mayor superficie sembrada en el año 2009 fueron Zacatecas, Chihuahua, San Luis Potosí, Sinaloa y Tamaulipas. La mayoría de los estudios realizados sobre diversidad del género *Capsicum* se basan en la evaluación de entre cuarenta y cincuenta caracteres morfológicos. Con la llegada de las sofisticadas técnicas de biología molecular para la determinación de la variabilidad y caracterización genética aplicada a especies animales y vegetales, se establece una nueva perspectiva sobre el estudio de la biodiversidad.

El término diversidad genética se refiere a qué tantas formas diferentes de expresión del genotipo existen (variaciones en constitución genética) y qué tan separadas están unas de otras. Se reconocen depósitos de esta información en forma de genes, alelos, cromosomas y su expresión en poblaciones y especies. La variación puede ser pequeña o puede ser de la magnitud para integrar

sistemas muy específicos para una función específica. El grado de variación se denomina divergencia genética (Kwiatkowska y López, 2000). La diversidad no es solo el resultado de factores ambientales y biológicos, sino también de procesos humanos de domesticación y diversificación. La distribución de la diversidad genética presenta un patrón de aislamiento por distancia, es decir, poblaciones más cercanas se parecen más entre sí que poblaciones más lejanas (Matsuoka et al., 2002).

Se han realizado varios estudios en relación a la diversidad, evolución y relaciones entre el género *Capsicum*, entre ellos, el realizado por McLeod et al., (1983) en el que, a través de análisis de proteínas se intentó establecer la relación entre las especies silvestres y domesticadas de *Capsicum* y sugerir a los posibles ancestros de estas últimas. Asimismo se han realizado estudios para la determinación de relaciones filogenéticas, basados en análisis de secuencias de DNA de regiones no codificantes del cloroplasto y genes nucleares (Walsh y Hoot, 2001). Guzmán et al., (2005), utilizaron marcadores moleculares de tipo AFLP para hacer una rápida y eficiente determinación de variabilidad genética presente en germoplasma de *Capsicum*, de colecciones nacionales *ex situ* de Guatemala. Pérez (2010) con uso de la técnica AFLP, analizó la variación genética de germoplasma de *Capsicum* de Tabasco, México así como sus relaciones con germoplasma de otras regiones y estableció patrones de diversidad genética *in situ* de *C. chinense* del estado de Tabasco.

Por RAPD, Sitthiwong et al., (2005) estudiaron el grado de similitud de diez accesiones de *C. annuum* en Tailandia. Las accesiones mostraron similitudes entre 20 y 90% con la formación de dos grupos principales, coherentes con las características morfológicas. También por RAPD se evaluó la variabilidad genética de nueve poblaciones presentes en el banco de germoplasma de *Capsicum* del sur de Brasil (Lopes et al., 2008).

Baltazar (1997) estudió la diversidad genética de *Capsicum* con isoenzimas y RFLPs en chiles serrano, jalapeño, manzano y silvestres e identificó chiles cultivados y silvestres mediante colectas de fruto fresco en quince estados de la República Mexicana (jardines y mercados) y luego determinó la variación entre estos tipos mediante análisis morfológicos, genéticos y bioquímicos y creó un banco de germoplasma de *C. annuum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. chinense*. Las relaciones genéticas entre 34 genotipos de Chile, en su mayoría comerciales (*C. annuum*), de diferentes tipos raciales y países se examinaron con marcadores RAPD y AFLP. Con marcadores RAPD se separó a las variedades de frutos largos dulces (menos divergente) de aquellos con frutos pequeños pungentes (Paran et al., 1998). Monteiro et al., (2013) a través de identificación de polimorfismos de

α - y β – esterasa determinaron la diversidad genética de 10 accesiones del banco de germoplasma pertenecientes a tres de las cinco especies cultivadas de *Capsicum*. Finger *et al.*, (2010) estimaron la diversidad genética de 49 accesiones de la especie *C. chinensis* a través del análisis de 12 rasgos físico-químicos de la fruta y 32 cebadores RAPD. Thul *et al.*, (2011) analizaron 22 accesiones de *Capsicum* pertenecientes a *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. eximium*, *C. frutescens* y *C. luteo* a través de 27 primers RAPD y ocho primers ISSR a fin de determinar similitudes genéticas. Los ISSRs es una técnica similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el primer es un di o trinucleótido repetido (Culler y Wolfe, 2001).

Con base en lo anterior, el presente se propone caracterizar la diversidad genética de 100 accesiones de *Capsicum annuum* depositadas en el banco de germoplasma del Campo Experimental Zacatecas del INIFAP, por medio de marcadores moleculares RAPDs.

MATERIALES Y METODOS

Germoplasma utilizado. De las 480 accesiones de *Capsicum annuum* con las que cuenta el banco de germoplasma, se seleccionaron 100 de importancia económica y agronómica para los estados de la República Mexicana que son productores de chile para secado. Se incluyeron colecciones de los estados de San Luis Potosí, Chihuahua y Zacatecas. Dentro de estas colecciones se incluyen variedades como chile mirasol, puya, pasilla, ancho, jalapeño, serrano y mulato.

Germinación y Extracción de ADN. Se utilizaron 52 semillas de cada accesión, las cuales fueron germinadas en charolas con sustrato estéril de una mezcla de peat moss y vermiculita, en el mes de febrero de 2013 bajo condiciones de invernadero a una temperatura de 30 ± 2 °C. Al llegar a la etapa de plántula, se tomaron las dos primeras hojas verdaderas de 10 plantas de cada accesión como representante poblacional de esta, para la extracción de ADN con el método de Dellaporta *et al.* (1983) con modificaciones.

Análisis RAPDs. Como una primera fase, se realizó un estudio exploratorio con solo 24 accesiones, para comprobar la detección de polimorfismos generados por ciertos RAPDs reportados en la literatura. De acuerdo con Baral y Bosland (2002), Fariando (2007) y Leite *et al.*, (2006), se propuso la serie de iniciadores mostrados en la Tabla 1.

El volumen final para la mezcla de reacción de RAPD fue de 10 μ l con la siguiente preparación: 1 μ l de buffer 10X, 0.8 μ l de MgCl₂ (50 mM), 0.2 μ l de dNTPs (2mM), 0.4 μ l de primer, 0.15 μ l de Taq polimerasa, 6.05 de H₂O destilada y 1 μ l de DNA molde.

Tabla 1. Iniciadores seleccionados para las pruebas de medición de la diversidad genética de *Capsicum annum* L.

Iniciador	Secuencia
OPAS-01	5' ctactgcgct ^{3'}
OPR-06	5' gtctacggca ^{3'}
OPAB-08	5' gttacggacc ^{3'}
OPA-18	5' aggtgaccgt ^{3'}
OPAA-11	5' accgacctg ^{3'}
OPAN-02	5' caccgcagt ^{3'}
OPA-04	5' aatcgggctg ^{3'}
OPA-20	5' gttgcatcc ^{3'}
OPA-02	5' tgccgagctg ^{3'}
OPA-12	5' tcggcgattag ^{3'}

Se utilizó un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización del DNA a 94°C por 5 minutos, y 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación del primer a 35°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos; extensión final a 72°C por 5 minutos (modificado de Lopes et al., 2008). Los productos RAPD se visualizarán en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1 % teñido con bromuro de etidio (Fariando, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSION

Siembra y germinación. Se obtuvo la germinación y desarrollo de plántulas de 95 accesiones (Figura 1). Las 5 restantes fueron inviables, quizás debido a la longevidad de más de 15 años que tenían estas accesiones, por lo que se descartaron del análisis.



Figura 1. Desarrollo de la plántula y presencia de hojas verdaderas.

Extracción de ADN. La calidad de ADN obtenida de las 95 accesiones fue óptima. La Figura 2 muestra solo 24 extractos de ADN de accesiones de chile mirasol para el análisis de RAPDs.

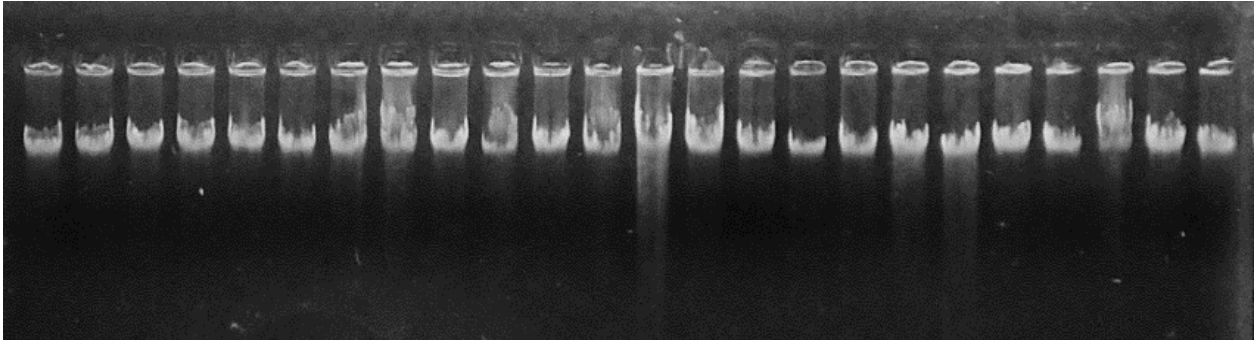


Figura 2. Calidad de ADN de 24 extractos de accesiones de chile mirasol

Análisis RAPDs. En un sondeo preliminar de 10 iniciadores (OPAS-01, OPR-06, OPAB-08, OPA-18, OPAA-11, OPAN-02, OPA-04, OPA-20, OPA-02, OPA-12) que generaron alrededor de 48 bandas RAPDs de los cuales 21 se consideraron polimórficas, con una tasa de polimorfismo de 2,04 polimorfismos por iniciador. El número de bandas oscilo entre 3 a 18 productos RAPDs obtenidos y el tamaño de las bandas varió de 250 a 1640pb. Se presentan solo los resultados de los iniciadores con mayores polimorfismos (Figuras 3, 4 y 5).

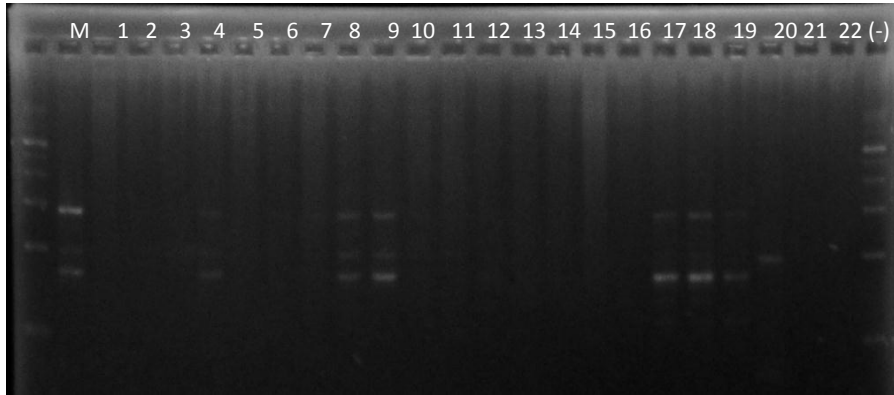


Figura 3. Polimorfismos RAPDs obtenidos con el iniciador OPAS-01. Carriles 1-22 ADN amplificado, Muestras 21, 22, 26, 28, 50, 51, 52, 66, 74, 75, 82, 87, 108, 109, 119, 120. (M) Marcador, (-) control negativo.

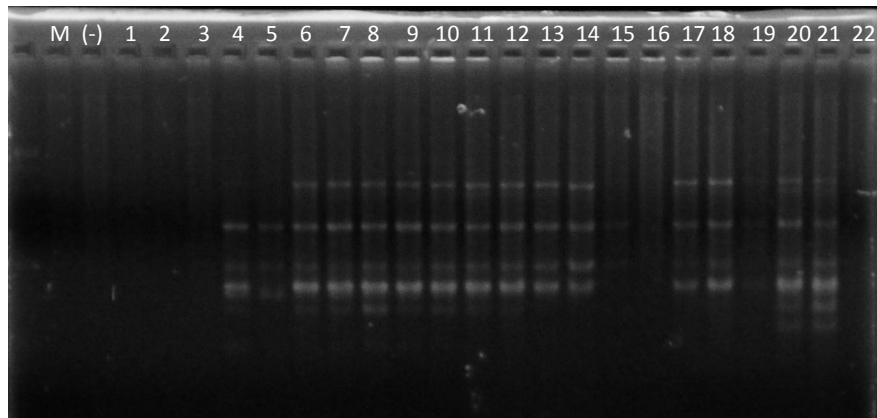


Figura 4. Polimorfismos RAPDs obtenidos con el iniciador OPAB-08. Carriles 1-22 ADN amplificado, Muestras 21, 22, 26, 28, 50, 51, 52, 66, 74, 75, 82, 87, 108, 109, 119, 120. (M) Marcador, (-) control negativo.

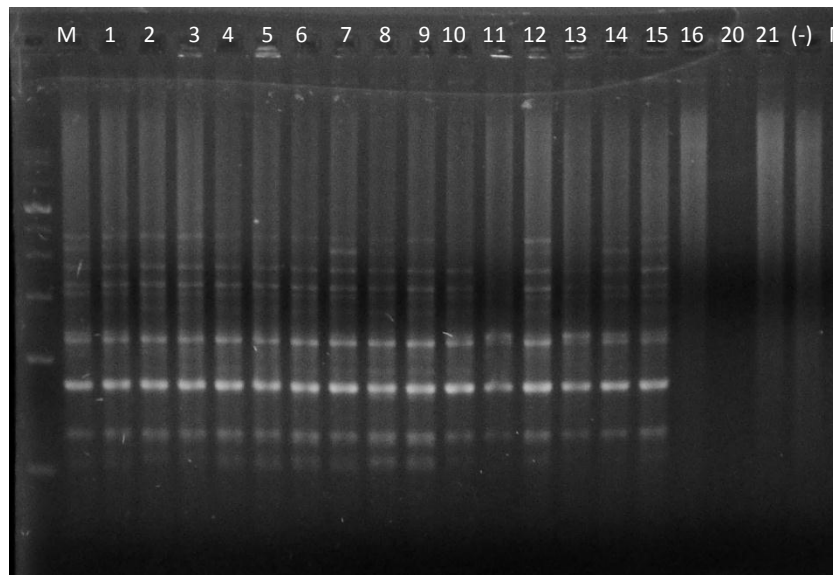


Figura 5. Polimorfismos RAPDs obtenidos con el iniciador OPAS-02. Carriles 1-21 ADN amplificado, Muestras 21, 22, 26, 28, 50, 51, 52, 66, 74, 75, 82, 87, 108, 109, 119, 120. (M) Marcador, (-) control negativo.

Estos resultados preliminares sugieren que existe una relativa diversidad genética de cultivares comerciales de Chile del banco de germoplasma del INIFAP-Zacatecas, lo cual significa que los cambios futuros en la estructura genética podrían ser comparados in situ con las variedades locales de las que provienen las accesiones evaluadas. Este estudio exploratorio, provee la justificación del seguimiento de estudios concretados a enfocarla utilidad de los recursos genéticos en los programas de mejoramiento del cultivo de Chile.

LITERATURA CITADA

Baral, J. y P. W. Bosland. 2002. Genetic Diversity of a *Capsicum* Germplasm Collection from Nepal as Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 316-324.

Baltazar, B. 1997. Diversidad genética del cultivo de Chile (*Capsicum* spp.) determinada por isoenzimas y RFLPs tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestres en su área de distribución. CONABIO proyecto No. G026. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos.cgi?Letras=G&Numero=26> (Fecha de consulta: Noviembre 2013).

- Culley M.T. y A.D. Wolfe. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86:545-556.
- Dellaporta S. L., T. Woods, y J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Fariando, D. 2007. Caracterización molecular de la colección de ajíes (*Capsicum spp*) y calabazas (*Cucurbita spp.*) del Banco de Gemoplasma del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Ecuador. Tesis Ingeniería Agropecuaria.
- Finger, F.L., S.D. Lannes, A.R. Schuelter, J. Doege, A.P. Comerlato, L.S.A. Goncalves, F.R.A. Ferreira, L.R. Clovis, y C.A. Scapim. 2010. Genetic diversity of *Capsicum chinensis* (Solanaceae) accessions based on molecular markers and morphological and agronomic traits. *Genetic and Molecular Research* 9 (3): 1852-1864
- Guzmán, F. A., H. Ayala, C. Azurdia, M.C. Duque, y M.C. Vicente. 2005. AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala: home gardens as an option for conservation. *Crop Science, Madison*, v. 45, p. 363- 370
- Kwiatowska T. y R. López (comps.). 2000. Ingeniería Genética y Ambiental, Problemas Filosóficos y Sociales de la Biotecnología. Conacyt-Plaza y Valdés. México. Pp: 153-168.
- Leite, D. L., D. Anthonisen, y R. L. Barbieri. 2006. Estimation of genetic divergence in pepper (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) revealed by RAPD markers. In: Annual meeting of the potato association of America, 90; International Solanaceae Conference, 5, Solanaceae Genomics Network, Madison.
- Lopes, D., D. Anthonisen, y R. L. Barbieri. 2008. Caracterização da variabilidade genética de populações locais de pimenta dedo-de-moça, utilizando marcadores RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa*.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, J. Sánchez, E. Buckler. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 : 6080-6084.
- McLeod M.J., S.I. Guttman, W. H. Eshbaugh, y R.E. Rayle. 1983. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution* 37: 562-574.

- Monteiro, E.R., A.R. Bronzato, G.R. Orasmo, A.C.A. Lopes, R.L.F. Gomes, C.A. Agnolin, y M.F.P.S. Machado. 2013. Genetic diversity analysis of *Capsicum* spp germoplasm bank accessions based on α - y β – esterase polymorphism. *Genetics and Molecular Research* 12 (2): 1155-1167.
- Paran, I., E. Aftergoot y Ch. Shifriss. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-173.
- Pérez, L. 2010. Diversidad genética del chiles (*Capsicum* spp.) del estado de Tabasco, México. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. 75 p.
- Pickersgill, B. 1983. Dispersal and distribution in crop plant. *Souderbd. Naturwiss ver Hamburg* 7: 285 – 301.
- Sitthiwong, K., T. Matsui, y S. Sukprakarn. 2005. Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions by RAPD analysis. *Biotechnology, Paquistão*, Vol. 4, n.4, p. 305-309.
- Thul, S. T., M. P. Darokar, A.K. Shasany, y S.P.S. Khanuja. 2011. *Molecular Profiling for Genetic Variability in Capsicum Species Based on ISSR and RAPD Markers*. Humana Press.
- Walsh, B. M, y S. B. Hoot. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. *Int. J. Plant Sci.* 162: 1409- 1418.