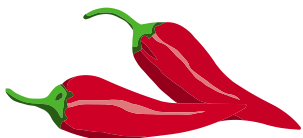


# COMPARACIÓN DE HUELLAS DE DNA EN HOJA Y FRUTO DE *Capsicum* spp.: INFERENCIA DE POLINIZACIÓN CRUZADA

## COMPARISON OF DNA FINGERPRINTS IN LEAVES AND FRUITS OF *Capsicum* spp.: INFERENCE OF CROSS-POLLINATION



Ibarra-Torres, P.<sup>1</sup>; Jaramillo-Flores, M.E.<sup>1</sup>; Valadez-Moctezuma, E.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN., C.P.11400, México D.F., México. <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma de Chapingo, km 38.5 carr. México - Texcoco. CP 56230, Chapingo, Estado de México, México.

**\*Autor responsable:** Ernestina Valadez-Moctezuma (evaladez@correo.chapingo.mx)

### RESUMEN

El género *Capsicum* comprende cinco especies mayormente cultivadas (*C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. y *C. pubescens*). México ocupa el segundo lugar de producción mundial, en donde el cultivo de *C. annuum* es de mayor importancia económica, cultural y social. Se compararon huellas de DNA en hoja y fruto de dos variedades de *C. annuum* (Jalapeño y Serrano) y una variedad de *C. pubescens* (Manzano) con marcadores genómicos ISSR, para estimar el grado de entrecruzamiento ocurrido en diferentes ambientes en plantas experimentales. Se obtuvieron de 32 a 44 amplicones por iniciador para PCR y en total se consideraron 76 fragmentos de diferentes pesos moleculares para realizar los análisis. Los valores de PIC, MI y Rp fueron de 0.75, 0.70 y 18.8 para hoja, y de 0.67, 0.62 y 20 para fruto. Con el iniciador Iso\_1 se obtuvieron porcentajes de polimorfismo de 91.3% para hoja y 87% en fruto de la misma planta. Los marcadores ISSR permitieron estimar el porcentaje de polinización cruzada, comparando la información genómica de estructuras de hoja y fruto en *Capsicum* spp., lo que puede acelerar el proceso de fitomejoramiento, permitiendo además, diferenciar a las tres variedades de chile, separar a los cultivares y estimar el nivel de polinización ocurrida en condiciones experimentales.

**Palabras clave:** *Capsicum* spp., Entrecruzamiento, Fitomejoramiento, ISSR, Marcadores de DNA.

### ABSTRACT

The *Capsicum* genus comprehends five species that are mostly cultivated (*C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. and *C. pubescens*). México occupies the second place in world production, with the *C. annuum* crop being of greater economic, cultural and social importance. DNA fingerprints in leaf and fruit of two varieties of *C. annuum* (Jalapeño and Serrano) and one variety of *C. pubescens* (Manzano) were compared with ISSR gene markers, in order to estimate the degree of crossing that took place in different environments in experimental plants. For each PCR primer, 32 to 44 amplicons were obtained, and in total 76 fragments of different molecular weights were considered to carry out the analyses. The PIC, MI and Rp values were 0.75, 0.70 and 18.8 for leaf, and de 0.67, 0.62 and 20 for fruit. With the Iso\_1 primer the percentages of polymorphism obtained were 91.3% for leaf and 87% for fruit from the same plant. The ISSR markers allowed estimating the percentage of cross-pollination, thus comparing the genetic information of leaf and fruit structures in *Capsicum* spp., which can accelerate the plant improvement process, also permitting to differentiate the three pepper varieties, separate the cultivars and estimate the level of pollination that took place under experimental conditions.

**Keywords:** *Capsicum* spp., Crosslinking, Breeding ISSR, DNA Markers.



## INTRODUCCIÓN

**El chile *Capsicum*** spp., (Solanáceas), es nativo de América latina e incluye 27 especies, cinco de las cuales son cultivadas (*C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. y *C. pubescens* Ruiz y Pavón) (Ibiza *et al.*, 2012). En el mundo se producen cerca de 32 MT, donde China se perfila como mayor productor y México como el segundo productor con cerca de 2.4 MT (FAOSTAT, 2012). En México el chile es de gran importancia cultural, social y económica debido a que es un producto de exportación, posee amplia distribución y su consumo es cada vez más generalizado, alcanzado un consumo per cápita de 8 a 9 kg, del cual 75% se consume en fresco (Castellón-Martínez *et al.*, 2012).

*C. annuum* presenta dos ciclos de floración; y dependiendo la especie, la morfología de la planta y del fruto pueden ser variables. La diferencia en flores se afecta por la temperatura del aire, especialmente por la noche. Las flores son completas, con el cáliz, corola y órganos sexuales masculinos y femeninos, son hipóginas y por lo general pentámeras. El estilo puede estar al mismo nivel que las anteras, por debajo de ellas o sobresalir ligeramente (Bosland y Votava, 2000). Las especies de *Capsicum* son generalmente auto-compatibles, y la polinización cruzada está asociada principalmente a insectos polinizadores con porcentajes que oscilan del 2% a 90%, pero pueden influir otros factores (Onus y Pickersgill, 2004). Se han llevado a cabo cruza-mientos experimentales interespecíficos en *Capsicum* con fines agronómicos y taxonómicos y se han producido híbridos fértiles de diversa magnitud entre los subtaxa integrantes del complejo *C. annuum* (Jarret y Dang, 2004); pero también con *C. baccatum* y con *C. pubescens* (Walsh y Hoot, 2001). Por otro lado, se han observado niveles de polinización cruzada de alrededor de 16.5% entre *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. baccatum*. Las hibridaciones espontáneas o híbridos interespecíficos naturales entre estas especies son difíciles de determinar, sin embargo, también han sido reportadas por autores como Jarret y Dang (2004). Reconocer el grado de entrecruzamiento es complejo debido a la taxonomía del género y a la amplia variación dentro de las especies domesticadas. Las hibridaciones entre poblaciones silvestres, semi silvestres y cultivadas locales pueden ser de ocurrencia regular y varían en el grado de fertilidad. Esta misma observación se ha hecho para poblaciones mejoradas genéticamente de *C. annuum* var. *annuum*, y entre variedades genéticamente modificadas con variantes cultivadas locales (Jarret y Dang, 2004; Kim *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2009b).

El uso de los marcadores moleculares ha sido exitoso en las últimas décadas. Los marcadores ISSR (Inter-Repeticiones de Secuencia Simple) han sido útiles para detectar polimorfismos de DNA, identificar genotipos y evaluar la diversidad genética. En *Capsicum* se han empleado para reconocer y seleccionar recombinantes meióticos con alteraciones en su genoma, con el fin de hacer una nueva selección de genotipos específicos (Gyulai *et al.*, 2000). También se han utilizado para estudiar cambios inducidos por injerto heredable en la forma del fruto de pimiento (*C. annuum*), mostrando que los cambios genéticos menores sólo afectaron al vástago durante el injerto (Tsa-

balla *et al.*, 2012). Estudiar el nivel de entrecruzamiento de *Capsicum* y sus especies radica en su uso para la implementación de programas de mejoramiento, por medio de la creación de métodos para promover o inducir la hibridación de especies con ciertas características deseadas. Por tal motivo se aplicaron marcadores ISSR para estimar el grado de entrecruzamiento de dos variedades de *C. annuum* (Serrano y Jalapeño) y una variedad de chile manzano (*C. pubescens*) desarrollados en diferentes ambientes con el fin de diferenciar las variedades mediante sus perfiles de DNA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon semillas híbridas de *C. annuum* variedad Hulk (Jalapeño) y de la variedad RSS-C36 (Serrano) (Agroseeds Chicuate S. de R.L); además de tipo Jalapeño variedad Ahutlán y tipo Serrano variedad Santo Tomás (Semini Vegetable Seeds, Inc, St. Louis, Missouri, USA). Para *C. pubescens* se emplearon semillas variedad Grajales ST. Los cultivos de *C. annuum* se establecieron en condiciones de campo en diferentes regiones (Cuadro 1); excepto en Chapingo, Estado de México donde se desarrollaron en invernadero con temperatura de 35 °C a 40 °C. Los cultivos de *C. pubescens* se establecieron en todas las localidades en condiciones de invernadero con temperatura de 18 °C a 25 °C. En el caso del desarrollo del cultivo en campo, las semillas fueron previamente germinadas en invernadero y las plántulas se trasplantaron a camas de suelo arcilloso de 10 m cada 50 cm. Estos cultivos (campo) se establecieron en el mismo terreno donde los productores sembraron simultáneamente las mismas variedades de chile.

**Cuadro 1.** Localidades y condiciones para el desarrollo de *Capsicum* spp. evaluadas.

Especie	Tipo de chile	Lugar de cultivo	Clave asignada*	Condiciones de cultivo
C. annuum	Jalapeño	Ixcuintla, Nayarit	JN <sup>a,x</sup>	Campo
	Serrano	El Marques, Querétaro	SQ <sup>b,x</sup>	
	Jalapeño		JQ <sup>a,x</sup>	
	Serrano	Celaya, Guanajuato	SG <sup>b,x</sup>	
	Jalapeño		JG <sup>a,x</sup>	
	Serrano	Guasave, Sinaloa	SS <sup>c,x</sup>	Campo
	Jalapeño	Sinaloa de Leyva, Sinaloa	JS <sup>d,x</sup>	
	Serrano	Chapingo, Estado de México	SE <sup>b,x</sup>	Invernadero
	Jalapeño		JE <sup>a,x</sup>	
C. pubescens	Manzano		ME <sup>e,l</sup>	Invernadero
		Villa Guerrero, Estado de México	MV <sup>e,l</sup>	
		Chignahuapan, Puebla	MP <sup>e,l</sup>	

\*La combinación de letras describe: tipo de chile (J: Jalapeño, S: Serrano, M: Manzano), localidad (N: Nayarit, Q: Querétaro, G: Guanajuato, E: Estado de Mexico, S: Sinaloa, V: Villa Guerrero, P: Puebla), variedad (a: Hulk, b: RSS-C36, c: Santo Tomas, d: Ahutlán, e: Grajales ST) y tipo de material (x: híbrido, l: línea).

### Desarrollo de marcadores

Se utilizaron hojas jóvenes y frutos sin semillas de la misma planta para obtener el DNA y realizar los análisis moleculares. Se desinfectaron por inmersión en soluciones de ddH<sub>2</sub>O, NaClO 30%, NaClO 10% durante cinco minutos, después en Etanol al 70% y finalmente en ddH<sub>2</sub>O estéril por 5 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### Extracción de DNA

El DNA genómico se extrajo con el kit Plant DNAzol<sup>®</sup> (Invitrogen), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El DNA se cuantificó a 260 nm y la pureza se determinó con la relación de 260/280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop<sup>™</sup> 1000 V3.7 (Thermo Fisher Scientific). De manera complementaria se estimó la calidad del DNA en geles de agarosa 1%.

### Marcadores ISSR

Se emplearon ocho iniciadores para ISSRs anclados en el extremo 5' o 3' sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, USA): Iso\_1 [AC(GACA)<sub>4</sub>], Iso\_2 [(AC)<sub>8</sub> YG], Iso\_3 [(AGAC)<sub>4</sub> GC], Iso\_6 [(GA)<sub>8</sub> YC], T [(GAGA)<sub>4</sub> YC], U [(CA)<sub>8</sub> RT], W [(GACA)<sub>4</sub> GT] y X [(TCC)<sub>5</sub> RY]. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 25 μL, que contenía buffer para Taq DNA pol adicionado con 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 1.5 U de GoTaq DNA Pol (PROMEGA), 60 ng de DNA genómico y 20

pM del iniciador correspondiente. Para la amplificación, se utilizó un termociclador Geneamp PCR system 9700 (Applied Biosystems) con el siguiente termociclaje: 1 ciclo a 94 °C, 1 min; 35 ciclos [94 °C, 30 s; 59 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C, 5 min. Los amplicones se separaron en geles de poliacrilamida 5%, usando como referencia el marcador de peso molecular de 1 kb (O'GeneRuler, Thermo Scientific), se tiñeron con AgNO<sub>3</sub> 0.2% (Valadez y Kahl, 2000) y el gel se documentó con luz blanca. Tanto las reacciones de PCR como la separación en los geles se llevaron a cabo al menos en tres ocasiones para verificar la reproducibilidad de los resultados.

Cada fragmento de DNA-ISSR fue considerado como locus independiente y se codificó visualmente en una matriz binaria de 1 y 0 (presencia-ausencia) en cada una de las muestras; solo aquellas huellas que resultaron reproducibles en las repeticiones, se utilizaron para los análisis respectivos. El tamaño de la banda se estimó mediante la comparación con el marcador de peso molecular de 1 kb. No se consideraron las diferencias en la intensidad de las bandas entre los perfiles de las diferentes muestras. Los datos moleculares obtenidos se utilizaron para elaborar el análisis de agrupamiento. La similitud genética entre accesiones se calculó de acuerdo al coeficiente de similitud de DICE (Dice, 1945) y el agrupamiento se llevó a cabo con el algoritmo Unweighted Pair Group Method

using Arithmetic average (UPGMA), utilizando el software DARwin versión 6.0.5 (Xavier Perrier & J P Jacquemoud-Collet, CIRAD-BIOS Department, UMR AGAP-Genetic Improvement and Adaptation of mediterranean and Tropical Plants Biomathematics team. Avenue Agropolis-TA A-108/03, 34398-Montpellier cedex 5, France).

La capacidad de cada primer para diferenciar los cultivares estudiados se evaluó por el Poder de Resolución ( $R_p$ ), Índice de marcador ( $MI$ ) y el Contenido de Información Polimórfica ( $PIC$ ), así como el porcentaje de bandas polimórficas ( $PPB$ ) el cual resulta de la relación de las bandas totales entre las bandas polimórficas. El valor de  $PIC$  fue calculado con la fórmula  $PIC_i = 1 - \sum (P_{ij})^2$  (Qiu et al., 2013), donde  $P_{ij}$  es la frecuencia de la  $i$ -ésima banda revelada por el  $j$ -ésimo iniciador sumado por todas las bandas amplificadas por los iniciadores. El valor de  $MI$  fue calculado para cada iniciador ISSR como  $MI = PIC \times \eta \beta$ , donde  $PIC$  es la media del valor de  $PIC$ ,  $\eta$  es el número de bandas y  $\beta$  es la proporción del polimorfismo (Qiu et al., 2013). El valor de  $R_p$  se calculó con la fórmula  $R_p = \sum l_b$  donde  $l_b$  representa la informatividad de la banda y se obtuvo con la fórmula  $l_b = 1 - (2 \times 10.5 - p_l)$  donde,  $p$  es la proporción de las accesiones que contiene la banda  $l$  (Prevost and Wilkinson, 1999).

### Cálculo del porcentaje de polinización

Se determinó a partir del número de huellas totales de DNA en hoja y fruto de cada cultivar de la siguiente manera:

$$\%P = \left( 1 - \left( \frac{B_{hoja}}{B_{fruto}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Donde: } \%P = \text{Porcentaje de polimorfismo; } B_{hoja} =$$

Bandas presentes en muestra de hoja;  $B_{fruto}$  = Bandas presentes en muestra de fruto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

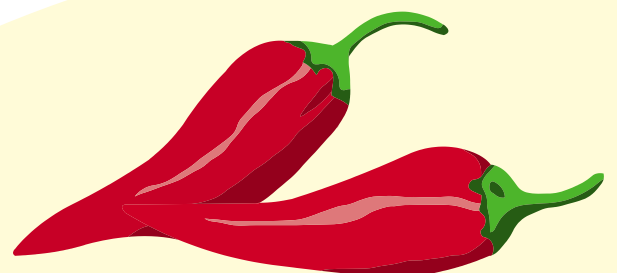
### Análisis ISSR

De los ocho iniciadores ISSR evaluados, se seleccionaron Iso\_1 e Iso\_2 debido a que mostraron amplicones consistentes en un rango de 150 a 2500 pb y muchos de ellos polimórficos entre los materiales evaluados; sin embargo, los seis restantes (Iso\_3, Iso\_6, T, U y W) mostraron perfiles aceptables pero con poca separación entre bandas de DNA que fueron de bajo peso molecular y siempre monomórficas (datos no mostrados), por lo cual se decidió no considerarlos para los análisis. En muestras de fruto se observó la presencia de nuevas bandas respecto a las amplificadas en hoja de cada cultivar (Cuadro 2). Este comportamiento se atribuyó a que el fruto pudo haber sido producto de polinización cruzada en campo, lo

que pudo generar recombinación genética en diferente medida (Arias y Duarte 2006). Los resultados evidenciaron diferencias entre los perfiles de DNA de ambos órganos; las huellas detectadas en las hojas correspondieron a la información de la planta madre y las huellas extra en el fruto (polimorfismos) correspondieron en mayor medida a la polinización abierta.

Uno de los resultados relevantes, fue que los representantes de las dos especies *C. annuum* y *C. pubescens* compartieron algunas huellas de DNA del mismo peso molecular. Por ejemplo, con el primer Iso\_2 (Figura 1) se visualizaron dos bandas monomórficas de alrededor de 2050 y 1100 pb presentes en hoja y fruto de las variedades Serrano y Jalapeño (señaladas como A y B); también se observaron otras bandas, entre ellas algunos polimorfismos entre muestras de hoja y fruto (bandas C y D; E y F); este dato se esperaba debido a que ambas variedades pertenecen a *C. annuum*. Sin embargo, se evidenciaron también otras bandas comunes entre los representantes de *C. annuum* y *C. pubescens* (señaladas como A, indicada arriba; ó G, H, I y J) cuyos pesos moleculares oscilaron entre 800 a menos de 500 pb.

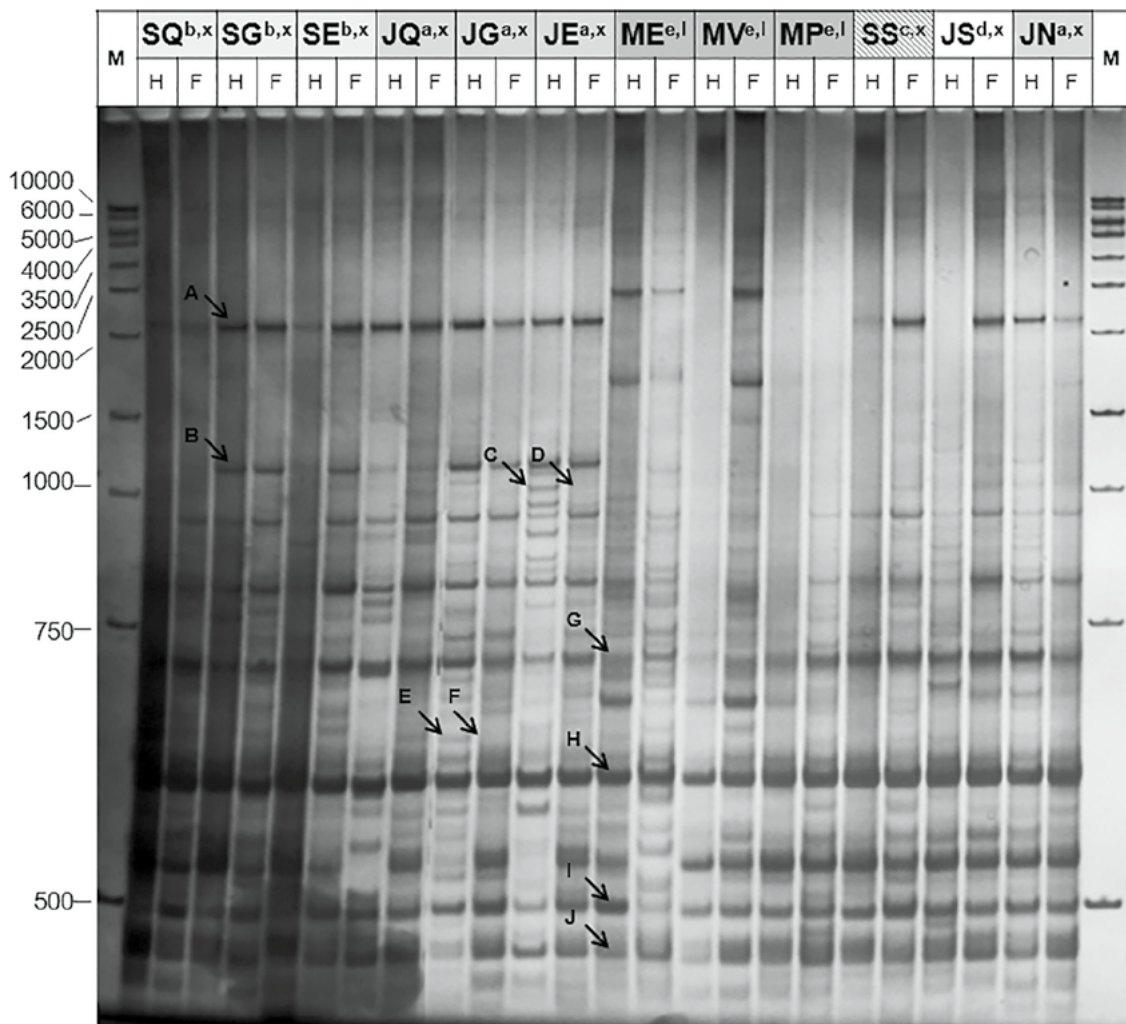
Es importante resaltar que las huellas de DNA comunes entre ambas



**Cuadro 2.** Numero de bandas totales en hoja y fruto de cada cultivar.

	Iso_1												Iso_2											
	SQ <sup>b,x</sup>	SG <sup>b,x</sup>	SE <sup>b,x</sup>	SS <sup>c,x</sup>	JQ <sup>a,x</sup>	JG <sup>a,x</sup>	JE <sup>a,x</sup>	JS <sup>d,x</sup>	JN <sup>a,x</sup>	ME <sup>e,l</sup>	MV <sup>e,l</sup>	MP <sup>e,l</sup>	SQ <sup>b,x</sup>	SG <sup>b,x</sup>	SE <sup>b,x</sup>	SS <sup>c,x</sup>	JQ <sup>a,x</sup>	JG <sup>a,x</sup>	JE <sup>a,x</sup>	JS <sup>d,x</sup>	JN <sup>a,x</sup>	ME <sup>e,l</sup>	MV <sup>e,l</sup>	MP <sup>e,l</sup>
Hoja	14	19	17	24	17	14	16	19	16	16	15	14	12	14	15	13	15	15	13	16	14	16	10	11
Fruto	20	22	21	26	20	17	20	21	25	18	24	16	15	18	16	17	17	17	16	17	16	17	19	15
%P	30	14	19	8	15	18	20	10	36	11	38	13	20	22	6	24	12	12	19	6	13	6	47	27

La combinación de las letras describen lo siguiente: tipo de chile (J: Jalapeño, S: Serrano, M: Manzano), localidad (N: Nayarit, Q: Querétaro, G: Guanajuato, E: Estado de Mexico, S: Sinaloa, V: Villa Guerrero, P: Puebla), variedad (a: Hulk, b: RSS-C36, c: Santo Tomas, d: Ahutlán, e: Grajales ST) y tipo de material (x: híbrido, l: línea). %P= % de Polimorfismo



**Figura 1.** Perfiles ISSR detectados con el iniciador Iso\_2, secuencia (AC)<sub>8</sub> YG en cultivares de *Capsicum* (H: Hoja, F: Fruto). Carril M=marcador de peso molecular de 1 Kb. La combinación de las letras describen lo siguiente: tipo de chile (J: Jalapeño, S: Serrano, M: Manzano), localidad (N: Nayarit, Q: Querétaro, G: Guanajuato, E: Estado de Mexico, S: Sinaloa, V: Villa Guerrero, P: Puebla), variedad (a: Hulk, b: RSS-C36, c: Santo Tomas, d: Ahutlán, e: Grajales ST) y tipo de material (x: híbrido, l: línea). Letras señaladas en gel: A y B: bandas monomórficas en hoja y fruto; C, D; E y F: bandas polimórficas en hoja y fruto; G, H, I y J: bandas monomórficas entre *C. annuum* y *C. pubescens*.

especies, sugieren una relación genómica/genética muy estrecha. Este resultado probablemente apoya lo reportado por Kim *et al.* (2014), quienes al secuenciar y comparar los genomas de *C. annuum* y *C. chinense* concluyeron que estas especies se diferenciaron solo en 1.8% en su genoma. Por otro lado, la polinización entre las distintas especies de Chile ha sido ya reportada (Walsh y Hoot, 2001), y los presentes resultados apoyan la idea de que las diferencias entre los genomas del resto de las especies de *Capsicum* también puede ser baja. Datos similares, pero obtenidos con marcadores SSR en estos mismos materiales fueron reportados recientemente por Ibarra-Torres *et al.* (2015). La evidencia de polimorfismos entre las muestras de hoja y fruto de *C. annuum*, se observó claramente en este estudio porque ambas estructuras pueden tener información genética diferente debido al entrecruzamiento genético ocurrido en el fruto.

Para las muestra de hojas en *C. pubescens* la similitud se mantuvo en el rango de 0.63 a 0.79 mostrando una distancia cercana entre  $MV^{e,l}$  y  $MP^{e,l}$  (0.79) y menor similitud genética entre  $MV^{e,l}$  y  $ME^{e,l}$  (0.63). Dentro de las muestras de *C. annuum* el grado de similaridad osciló de 0.44 a 0.94, mostrando una distancia genética cercana entre  $SG^{b,x}$  y  $SQ^{b,x}$  (0.94) y menor similitud entre  $JS^{d,x}$  y  $JE^{a,x}$  (0.44). Entre jalapeños y serranos el grado de similaridad osciló de 0.50 a 0.83, mostrando una distancia genética cercana entre  $SG^{b,x}$  y  $JG^{a,x}$  (0.83) y menor similitud entre  $JS^{d,x}$  con  $SQ^{b,x}$  y  $SG^{b,x}$  (0.50).

La variación entre chiles Serrano y Jalapeño fue de 0.50 a 0.83, mostrando una relación cercana entre  $JG^{a,x}$  y  $SG^{b,x}$  (0.83) y menor similitud genética entre  $SG^{b,x}$  y  $SQ^{b,x}$  con  $JS^{d,x}$  (0.50). Los rangos de índices de similitud para *C. pubescens* y variedades de Jalapeño y Serrano (*C. annuum*) fueron de 0.63 a 0.79, 0.44 a 0.94 y 0.50 a 0.83 respectivamente, indicando que existe un alto nivel de similitud y un bajo nivel de variación entre los cultivares en las condiciones evaluadas, incluso entre ambas especies. Los valores de distancia genética no se incluyeron en ambos dendrogramas.

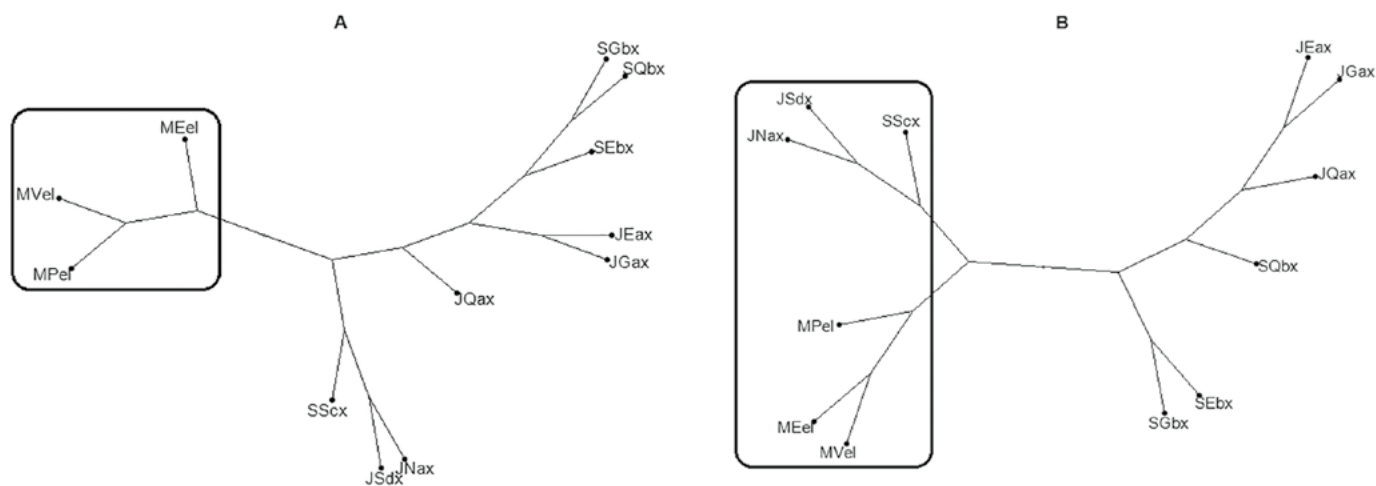
El análisis de agrupamiento para los primers Iso\_1 e Iso\_2 en muestras de hoja, separaron los cultivares en dos grupos principales (Figura 2 A). El grupo mayor se conformó con las dos variedades de *C. annuum*, los chiles Serranos ( $SQ^{b,x}$ ,  $SG^{b,x}$  y  $SE^{b,x}$ ) y los Jalapeños ( $JE^{a,x}$ ,  $JQ^{a,x}$  y  $JG^{a,x}$ ); todos diferentes entre sí, evidenciando la diferenciación intraespecífica a nivel de huellas de DNA;

aunque existió la tendencia de que los Jalapeños se mantuvieran cercanos entre sí, pero no lograron separarse totalmente de los Serranos.

El segundo agrupamiento se constituyó por los genotipos de *C. pubescens* ( $ME^{e,l}$ ,  $MV^{e,l}$  y  $MP^{e,l}$ ), ubicados dentro del recuadro, denotando una diferencia interespecífica e intraespecífica. Se han utilizado anteriormente primers ISSR, logrando separar las especies *C. annuum* de *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. eximium*, *C. frutescens*, y *C. luteum* (Thul *et al.*, 2012). En la presente investigación, se demostró que los marcadores ISSR seleccionados son útiles también para diferenciar variedades de Jalapeños y Serranos; así como, para separar las dos especies consideradas en el estudio. La diferenciación eficiente entre estas dos especies fue relativamente fácil porque se trató de materiales de línea (*C. pubescens*) e híbridos (*C. annuum*), sabiendo que el material de línea es un cultivar homocigoto en muchas partes del genoma a diferencia del material híbrido.

En muestras de fruto, los coeficientes de similitud en *C. pubescens* oscilaron de 0.74 a 0.86 mostrando una distancia cercana entre  $MV^{e,l}$  y  $ME^{e,l}$  (0.86) y menos similitud genética entre  $ME^{e,l}$  y  $MP^{e,l}$  (0.74); dentro *C. annuum* los valores variaron de 0.48 a 0.93, con relación cercana entre  $JG^{a,x}$  y  $JE^{a,x}$  (0.93) y menos similitud genética entre  $JN^{a,x}$  y  $JG^{a,x}$  (0.48); para Chile Serrano y Jalapeño (*C. annuum*) los coeficientes variaron de 0.50 a 0.90, mostrando una distancia genética cercana entre  $JG^{a,x}$  y  $SQ^{b,x}$  (0.90) y menos similitud genética entre  $SQ^{b,x}$  y  $SE^{b,x}$  con  $JN^{a,x}$  (0.50).

Los intervalos de índices de similitud para *C. pubescens* y *C. annuum* (Jalapeño-Serrano) fueron 0.74 a 0.86, 0.48 a 0.93 y 0.50 a 0.90 respectivamente, indicando que existe alto nivel de similitud y bajo nivel de diversidad entre los genotipos. El análisis de agrupamiento para las muestras de frutos con cada iniciador (Iso\_1 e Iso\_2), también separó a los materiales en dos grupos principales (Figura 2 B); pero en este caso, no se separaron los chiles Manzanos (*C. pubescens*) de las variedades de *C. annuum*; un ejemplo claro se señala en el recuadro de la Figura 2B. Este comportamiento, aunque contradictorio a lo que se esperaba, tiene sentido si se considera que las especies de *Capsicum* evidencian poca diferencia genómica; y en el presente caso, ambas especies y variedades evaluadas, comparten varios marcadores genéticos; lo que sugiere que también comparten similitudes provenientes posiblemente de ancestros comunes. Esta



**Figura 2.** Dendrogramas obtenidos con los primers Iso\_1 (AC(GACA)<sub>4</sub>) e ISO\_2 ((AC)<sub>8</sub> YG) en muestras de hoja (A) y fruto (B) de Chile, usando el coeficiente DICE para el agrupamiento de las especies. La combinación de las letras describen lo siguiente: tipo de Chile (J: Jalapeño, S: Serrano, M: Manzano), localidad (N: Nayarit, Q: Querétaro, G: Guanajuato, E: Estado de México, S: Sinaloa, V: Villa Guerrero, P: Puebla), variedad (a: Hulk, b: RSS-C36, c: Santo Tomas, d: Ahutlán, e: Grajales ST) y tipo de material (x: híbrido, l: línea).

misma información fue observada con los perfiles de los iniciadores Iso\_3, Iso\_6, T, U y W (datos no mostrados). De esta manera, los dendrogramas obtenidos indicaron que a nivel de hoja, las huellas lograron separar a ambas especies; sin embargo, a nivel de fruto no fue posible diferenciarlas; mismo comportamiento reportado por Ibarra-Torres *et al.*, (2015) pero con marcadores SSR. Los dos iniciadores revelaron en total 76 bandas (TB), con un promedio de 93% de bandas polimórficas (PPB) y 37.5 bandas por primer (Cuadro 3). En general, los valores de PIC, PPB, MI y Rp resultaron mayores con Iso-1 que con Iso-2; en este sentido, el iniciador Iso-1 fue más eficiente.

Ambos iniciadores (Iso-1 e Iso-2) mostraron diferentes valores PIC en hoja y fruto de la misma planta. Lo anterior se atribuye al efecto de polinización cruzada ocurri-

da (Martin y González, 1991), tomando en cuenta que la planta de Chile es monoica y aunque es autógena, puede ser fecundada con el polen de una planta vecina (Arias y Duarte, 2006), lo que ha permitido reportes que oscilan de 7% a 91% de polinización cruzada en campo. El grado de polinización cruzada afecta las medidas necesarias para producir semillas; así como las metodologías de mejoramiento utilizados por el fitomejorador (Bosland, 1993). En este trabajo se demostró que los marcadores de DNA son buena herramienta para acelerar este proceso.

**CONCLUSIONES**

Se demostró que los marcadores ISSR seleccionados son eficaces para estimar el porcentaje

**Cuadro 3.** Contenido de Información Polimórfica e índices de marcador en hoja y fruto de cada cultivar de chiles (*Capsicum* spp.).

Iniciador	Estructura	PIC	MI	Rp	PPB	(TB)	(PB)	(TA)	Tamaño producto (bp)
Iso-1	Hoja	0.78	0.77	22.83	98%	44	43	59 °C	150-2500
	Fruto	0.71	0.69	25.33					
Iso-2	Hoja	0.72	0.63	14.67	88%	32	29		
	Fruto	0.63	0.55	14.67					
Promedio	Hoja	0.75	0.70	18.75	93%	37.5	36		
	Fruto	0.67	0.62	20.00					
Total						76	72		

de polinización cruzada a través de la comparación de la información genómica de la hoja y del fruto de *Capsicum* spp., lo que puede ayudar a acelerar el proceso de mejoramiento genético. De acuerdo a los intervalos de índices de similaridad encontrados en el estudio, existe mayor similitud y baja diversidad entre las variedades de *C. pubescens* y *C. annuum*. Se demostró que ambas especies y variedades presentaron marcadores de DNA comunes. El análisis de agrupamiento en las muestras de hojas separó al chile Manzano; pero no a los chiles Jalapeños de los Serranos; mientras que las huellas de DNA de fruto no lograron diferenciar a ninguna de las variedades.

## AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece la beca otorgada por CONACYT para estudios de doctorado.

## LITERATURA CITADA

- Arias-Rivera O.U., Duarte-Rivas C.A. 2006. Determinación de las dosis efectivas del biopreparado *Trichoderma* (koningii y harzianum) sobre *Sclerotium rolfsii* causante del mal del talluelo en chile dulce (*Capsicum annuum*) en época lluviosa. Tesis de Licenciatura. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas.
- Bosland P.W. 1993. An Effective Plant Field Cage to Increase the Production of Genetically Pure Chile (*Capsicum* spp.) Seed. Hort Science 28(10):1053.
- Bosland P.W., Votava E.J. 2000. Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. Crop Production Science in Horticulture 12. CAB International Publishing, Wallingford, England, UK. 204 pp.
- Castellón-Martínez E., Chávez-Servia J.L., Carrillo-Rodríguez J.C., Vera-Guzman A.M. 2012. Preferencias de consume de chiles (*Capsicum annuum* L.) nativos en los valles centrales de Oaxaca, México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (Número Especial 5): 27-35.
- Dice L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology, 26, 297:302.
- FAOSTAT. 2012. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>
- Gyulai G., Gemesne J.A., Sagi Zs., Venczel G., Pinter P., Kristóf Z., Törjék O., Heszky L., Bottka S., Kiss J., Zatykó L. 2000. Doubled Haploid Development and per-analysis of F1 Hybrid Derived DH-R2 Paprika (*Capsicum annuum* L.) Lines. J Plant Physiol 156:168-174.
- Ibarra-Torres P., Valadez-Moctezuma E., Pérez-Grajales M., Rodríguez Campos J., Jaramillo-Flores M.A. 2015. Inter- and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. Scientia Horticulturae. Volume 181: 137-146.
- Ibiza V.P., Blanca J., Cañizares J., Nuez F. 2012. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. Genet Resour Crop Evol 59:1077-1088. DOI 10.1007/s10722-011-9744-z
- Jarret R.L., Dang P. 2004. Revisiting the waxy locus and the *Capsicum annuum* L. complex. Georgia Journal of Science 62: 117-133.
- Kim C-G., Kim D.I., Kim H-J., Park J.E., Lee B., Park K.W., Jeong S-C., Choi K.H., An J.H., Cho K-H., Kim Y-S., Kim H.M. 2009a. Assessment of Gene Flow from Genetically Modified Anthracnose-Resistant Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) to a Conventional Crop. Journal of Plant Biology 52: 251-258.
- Kim C-G., Park K.W., Lee B., Kim D.I., Park J-Y., Kim H-J., Park J.E., An J.H., Cho K-H., Jeong S-C., Choi K.H., Harn C.H., Kim H.M. 2009b. Gene flow from genetically modified to conventional chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Science 176: 406-412.
- Kim S., Park M., Yeom S., Kim Y., Lee J., Lee H., Seo E., Choi J., Cheong K., Kim K., Jung K., Lee G., Oh S., Bae C., Kim S. B., Lee H. Y., Kim S. Y., Kim M.S., Kang B.C., Jo Y.D., Yang H.B., Jeong H.J., Kang W.H., Kwon J.K., Shin C. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. Nat Genet. 46, 270-278. doi:10.1038/ng.2877
- Martín N.C., González E.G. 1991. Caracterización de Acciones de Chile (*Capsicum* spp.). Agronomía Mesoamericana 2: 31-39.
- Onus A.N., Pickersgill B. 2004. Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution. Annals of Botany 94: 289-295, 2004. doi:10.1093/aob/mch139
- Prevost A., Wilkinson M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 98, 107-112
- Qiu C., Yan W., Li P., Deng W., Song B., Li T. 2013. Evaluation of Growth Characteristics and Genetic Diversity of Commercial and Stored Lines of *Hypsizygus marmoreus*. International Journal of Agriculture Biology, 15(3), 479-485.
- Thul S.T., Darokar M.P., Shasany A.K., Khanuja S.P. 2012. Molecular Profiling for Genetic Variability in *Capsicum* Species Based on ISSR and RAPD Markers. Molecular Biotechnology, 51, 137-147.
- Tsabalá A., Athanasiadis C., Pasentsis K., Ganopoulos I., Obeidat I.N., Tsaftaris A. 2012. Molecular studies of inheritable grafting induced changes in pepper (*Capsicum annuum*) fruit shape. Scientia Horticulturae, 149 (4), 2-8.
- Valadez-Moctezuma E., Kahl G. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-prensa México ISBN 968-7462-22-1.
- Walsh B.M., Hoot S.B. 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(6):1409-1418.