

**Formación de poblaciones de chile (*Capsicum annuum* L.) para  
selección recurrente y caracterización mediante marcadores AFLP**

REINALDO MÉNDEZ AGUILAR

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**



**Universidad Autónoma Agraria  
“Antonio Narro”**

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Febrero de 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**“ANTONIO NARRO”**

**SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**Formación de poblaciones de chile (*Capsicum annuum* L.) para selección recurrente y caracterización mediante marcadores AFLP**

**TESIS**

**POR**

**REINALDO MÉNDEZ AGUILAR**

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**

**COMITÉ PARTICULAR**

Asesor principal: \_\_\_\_\_  
Dr. Gaspar Martínez Zambrano

Asesor: \_\_\_\_\_  
M.C. Moisés Ramírez Meraz

Asesor: \_\_\_\_\_  
Dr. Alfonso López Benitez

Asesor: \_\_\_\_\_  
Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez

Asesor: \_\_\_\_\_  
Dr. Humberto de León Castillo

\_\_\_\_\_  
Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Subdirector de postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.  
Febrero de 2007

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Gaspar Martínez Zambrano, por su amistad y por haberme apoyado en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez, M. C. Moisés Ramírez Meraz, Dr. Alfonso López Benitez, y Dr. Humberto de León Castillo, por sus observaciones y sugerencias durante la revisión del presente trabajo.

Al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN), por todas las facilidades proporcionadas con instalación y equipo para poder desarrollar la parte molecular de este trabajo de investigación.

A M.C. Sanjuana Hernández, por su apoyo en la capacitación con marcadores AFLP.

A la familia Quintero Carrillo, por haberme brindado su confianza.

A la familia Rivera Niño, por su hospitalidad y apoyo.

A mi futura esposa Magda Lorena, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigos (Omar Gómez, Roberto Escamilla, Rafael Mejia, Don Jesús, Alejandro Rivera y Ricardo Rivera).

A mi Alma Mater, por haberme dado la oportunidad de superarme.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Por haberme dado la mejor familia de todas.

### **A mi abuelita Margarita León Viuda de Aguilar**

Por quererme como un hijo y por sus sabios consejos.

### **A mis Hermanos**

Roxana, Mary, Rosario, Olga, Paco, Baldemar, Rosy, José Luis, por su confianza y apoyo.

### **A mis cuñados**

Tony, Manuel, Yoly y Lorena.

### **A mis sobrinos**

Ruby Violeta, Héctor Manuel, Oswaldo, Darío Omar, Andrea Guadalupe, Dulce Berenice, Ivet Verónica, Belén del carmen, Eduardo, Rodrigo y María Fernanda.

En especial a mi mamá, María Luisa Aguilar E.

Por haberme dado la oportunidad de estudiar y apoyarme en todo momento.

## COMPENDIO

### Formación de poblaciones de chile (*Capsicum annuum* L.) para selección recurrente y caracterización mediante marcadores AFLP

POR

REINALDO MÉNDEZ AGUILAR

MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. FEBRERO DE 2007.

Dr. Gaspar Martínez Zambrano -Asesor-

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, poblaciones, AFLP

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de formar poblaciones de amplia base genética a través cruza intra e inter-raciales, así como la caracterización de estas mediante marcadores AFLP. Se utilizaron materiales de los tipos raciales ancho, guajillo, serrano y jalapeño. Se partió de 37 cruza progenitoras intra e inter-raciales y con ellas se formaron tres poblaciones intra-raciales P-SXS, P-JXJ, P-GXG y cuatro inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, incluyendo la inter-racial macro P-AXGXJXS, de acuerdo con la técnica de recombinación denominada por Márquez (1994) cruza mesofraternales con mezcla de polen. Esta parte se realizó en el invernadero No.8 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México.

La parte molecular se desarrollo en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN), en Reynosa, Tamaulipas. Se extrajo el ADN de 15 plantas jóvenes por población, se utilizó la metodología de Dellaporta *et al.*, (1983) con mínimas modificaciones, en el laboratorio vegetal II del CBG. Los marcadores se efectuaron siguiendo el protocolo de (Vos *et al.*, 1995).

Con los datos generados por AFLP, se obtuvo una base de datos de 203 loci obtenidos de cuatro combinaciones, esta información se utilizó para determinar el índice de diversidad, mediante la fórmula de Powell *et al.*, (1996), para conocer el índice de diversidad de las siete poblaciones. Se encontró que la población P-AXGXJXS fue la que tuvo mayor variabilidad con 0.48, seguida de P-GXG con 0.40.

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ), tanto entre poblaciones como dentro de poblaciones, con un porcentaje de variación de 37% y 63% respectivamente. Esto indica una relación estrecha entre las siete poblaciones.

Las distancias genéticas de las poblaciones se calcularon por el método propuesto por (Nei y Li, 1979), usando el paquete de software PHYLIP Versión 3.6 (Felsenstein, 2005). La matriz de distancias generadas se utilizó para producir un dendrograma por medio del método UPGMA (Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas). Se encontró que se formaron dos grupos: en el primero se encontraron las poblaciones P-AXGX JXS y P-GXG, y fue en este donde se encontraron las poblaciones más heterogéneas; el segundo grupo a su vez se dividió en tres subgrupos: en el primero se encontró la población P-GXS; en el segundo P-JXJ, P-GXJ y en el tercero P-JXS y P-SXS. En el segundo grupo las poblaciones fueron más homogéneas.

La formación de poblaciones mediante la recombinación de dos o más tipos raciales incrementa la variabilidad genética y las hace apropiadas para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente, dependiendo de los tipos raciales involucrados.

## **ABSTRACT**

**Formation of populations of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) for recurrent selection and characterization by means of markers AFLP**

**BY**

**REINALDO MÉNDEZ AGUILAR**

**MASTER IN SCIENCE  
PLANT BREEDING**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. FEBRUARY, 2007.**

**Dr. Gaspar Martínez Zambrano -Advisor-**

**Key words: *Capsicum annuum*, populations, AFLP**

The present work development with the objective to form populations of ample genetic base doing crosses intra and Inter-racial, as well as the characterization of these by means of markers AFLP, for to begin a program of breeding by recurrent selection. Materials of the racial types ancho, guajillo, serrano and jalapeño were used. It was split was from 37 crosses parents intra and inter- raciales and with them were formed three intra-raciales populations P-SXS, P-JXJ, P-GXG and four inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, including inter-racial macro P-AXGXJXS, in agreement with the technique of recombination denominated by Marquez (1994) crosses mesofraternal with mixture of pollen. This part was realized in the greenhouse No.8 at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, in Saltillo, Coahuila, México.

The molecular part development in the Centro de Biotecnología Genómica (CBG) of Instituto Politécnico Nacional (IPN), in Reynosa, Tamaulipas. The DNA of 15 young plants by population was extracted, used the methodology of Dellaporta

*et al.*, (1983) with minimum modifications, in the vegetal laboratory of the CBG. The markers were effected following the protocol of (Vos *et al.*, 1995).

With the data generated by AFLP, was obtained data base of 203 loci with four combinations, this information was used to determine the diversity index, means of formulate by (Powell *et al.*, 1996), to know the index diversity of the seven populations. Was found that the population P-AXGXJXS was the one that had greater variability with 0.48, followed of P-GXG with 0.40.

In the analysis of molecular variance (AMOVA) significant differences ( $p < 0.0001$ ) were detected, so much between populations as within populations, with a percentage of variation of 37% and 63% respectively. This indicates a close relationship between the seven populations.

The genetic distances of the populations were calculated by the method proposed by (Nei and Li, 1979), using the software package PHYLIP Version 3.6 (Felsenstein, 2005). The matrix of generated distances was produced a dendrogram by means of method UPGMA (Method of group of pairs nonweighed with average Arithmetics). Was found that two groups were formed: in first were populations P-AXGX JXS and P-GXG in this was where it was the more heterogeneous populations, the second group divided itself as well in three sub-groups: in first was population P-GXS; in second P-JXJ, P-GXJ and third P-JXS and P-SXS. In the second group the populations were more homogenous.

The formation of populations by means of the recombination of two or more racial types increases the genetic variability and it makes appropriate to make population improvement by recurrent selection, depending on the involved racial types.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Páginas</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Metas.....	3
Hipótesis.....	3
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Cultivo de chile.....	4
Mejoramiento en chile.....	5
Marcador genético.....	7
Marcadores moleculares.....	8
RFLP.....	9
RAPD.....	9
Microsatélites o SSR.....	9
AFLP.....	10
Aplicaciones de marcadores moleculares ADN.....	12
Trabajos relacionados con marcadores moleculares en chile.....	12
III.- MATERIALES Y METODOS.....	15
Poblaciones intra-raciales.....	15

Poblaciones inter-raziales.....	16
Caracterización de las poblaciones mediante marcadores genéticos moleculares.....	18
Extracción de ADN.....	18
Marcadores genéticos moleculares.....	20
Digestión-ligación de ADN.....	20
Pre-amplificación y amplificación selectiva.....	21
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	24
Revelado de productos amplificados.....	25
Análisis genético.....	26
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Formación de poblaciones.....	27
Análisis AFLP.....	27
V.- CONCLUSIONES.....	34
VI.- SUGERENCIAS.....	35
RESUMEN.....	36
VII.- LITERATURA CITADA.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Páginas</b>
3.1	Progenitores utilizados para formar poblaciones intra-raciales.....	16
3.2	Progenitores utilizados para formar poblaciones inter-raciales.....	17
3.3	Mezcla para digestión.....	20
3.4	Mezcla para ligación.....	21
3.5	Mezcla para pre-amplificación.....	22
3.6	Programa para pre-amplificación.....	22
3.7	Mezcla para amplificación selectiva.....	23
3.8	Combinación de primers.....	23
4.1	Productos amplificados por combinación mediante AFLP.....	28
4.2	Análisis de varianza molecular (AMOVA) de poblaciones de chile mediante AFLP.....	29
4.3	Índice de diversidad genética de poblaciones de chile con base en la formula de (Powell <i>et al.</i> , 1996).....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Páginas</b>
1	Dendograma de disimilitudes genéticas entre poblaciones de chile con base en el método UPGMA y datos AFLP.....	33

## ABREVIATURAS

% = por ciento

μl = microlitros

°C = grados centígrados

A = adenina

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

AFLP = Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados

C = citosina

cm = centímetro

CV = Coeficiente de variación

CONAPROCH = Consejo Nacional de Productores de Chile

dNTPs = mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos (dATP + dGTP + dCTP + dTTP)

EDTA = sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

gr = gramo

G = guanina

hr = horas

INIFAP = Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

l= litro

M = molar

mA = miliamper

min = minuto

mg = miligramos

msnm = metros sobre el nivel del mar

ng/ $\mu$ l = nanogramos por microlitro

pb= pares de bases

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

RAPD = ADN Polimórfico Amplificado al Azar

RFLP= Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

rpm = revoluciones por minuto

seg = segundos

SSR = Secuencias Simples Repetidas

T = timina

TBE = tris/ácido bórico/sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

TEMED = N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamino

Tris-HCl = trizma/ácido clorhídrico

U/ $\mu$ l = unidades por microlitro

## I.- INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) pertenece a la familia de las Solanáceas. Se considera una de las hortalizas de mayor importancia económica y social en nuestro país, el cual es su centro de origen y diversidad. Sus frutos son utilizados por su sabor, pungencia, acción farmacológica y también por su calidad en la obtención de colorantes.

Se ubica entre las siete hortalizas mas producidas en el mundo con una producción de 25, 015,498 toneladas. China es el país que presenta una mayor producción a nivel mundial con 12, 531,000 toneladas, México ocupa el segundo lugar ya que se siembran 140,693 hectáreas que producen 1, 853,610 toneladas (FAOSTAT, 2006); citado por CONAPROCH (2006). Las exportaciones de chile verde en 2003 representaron una aportación de 424, 930,000 dólares (CONAPROCH, 2006).

Por lo antes mencionado, es necesario buscar nuevas formas para incrementar la producción y además mejorar características que estén relacionadas con la calidad comercial (tamaño, color, forma, pungencia, entre otras), así como caracteres de interés agronómico como: altura intermedia, precocidad y sanidad, para que los productos que se produzcan en el país sean de calidad y tengan más competitividad en el mercado nacional e internacional. Una alternativa es el mejoramiento genético para la generación de mejores o nuevos materiales.



El mejoramiento de Chile se ha realizado mediante esquemas de selección conocidos como: selección genealógica, método masivo y descendencia de una semilla, que utilizan por lo general dos progenitores y su progenie se somete a endocria y selección continua, hasta que alcanzan homocigosis total.

Sin embargo, la atención también ha sido puesta sobre esquemas de selección utilizados en especies alógamas, la selección recurrente. Con este método se seleccionan y recombinan de forma cíclica, aquellas plantas con expresiones fenotípicamente superiores. Permite aumentar la frecuencia de genes favorables en caracteres cuantitativos en una población, sin pérdida significativa de variabilidad genética.

A pesar del éxito logrado con la aplicación de esquemas de selección recurrente para el mejoramiento poblacional en especies alógamas como el maíz (Hallauer *et al.*, 1988), las experiencias en especies autógamas han sido poco estudiadas, lo que puede ser atribuido a la falta de evidencia empírica experimental de sus ventajas y beneficios, así como a la falta de poblaciones de Chile de amplia base genética caracterizadas, para este método. La caracterización genética es un asunto esencial en cualquier programa de mejoramiento, es por esto que se utilizan los marcadores moleculares AFLP para analizar la variabilidad genética entre poblaciones, sin efecto ambiental.

Por lo anterior se propuso realizar este trabajo de investigación, utilizando una estrategia de mejoramiento integral, poco convencional en este cultivo, basado en cruces intra e inter-raciales de varios progenitores, con los tipos serrano, jalapeño, guajillo y ancho, para reunir la más amplia variación genética en cada una de las

poblaciones y crear las condiciones para obtener mejores variedades de las cuatro razas y posibles nuevas combinaciones.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos, metas e hipótesis:

### **Objetivos**

Formar poblaciones de amplia base genética aprovechables en un programa de mejoramiento por selección recurrente.

### **Metas**

1. Formar poblaciones dentro y entre pares de tipos raciales, así como una población-macro involucrando los cuatro tipos de Chile.
2. Caracterizar y analizar mediante marcadores moleculares la variabilidad genética generada en las poblaciones.

### **Hipótesis**

Las poblaciones formadas con la recombinación de varios progenitores entre tipos raciales, representan una estrategia de mejoramiento con base en la mayor variabilidad y diversidad genética acumulada.

## II.- REVISIÓN DE LITERATURA

### Cultivo de chile

El chile tiene una larga tradición en la dieta alimenticia de la población mexicana, por lo que es uno de los ingredientes que la identifica y ha sido muy apreciado como condimento desde tiempos prehispánicos (Long, 1998).

Pertenece a la familia de las Solanáceas, junto con tomate, papa, berenjena, petunia y tabaco según Prince *et al.* (1992) citados por Martínez *et al.* (2004). Es una especie autógena, monoica, de flores completas y perfectas (Ramiro, 1986). Es una planta herbácea de crecimiento determinado. Su raíz es pivotante con numerosas raíces adventicias. La altura de las plantas varía de 0.30 a 1 m. dependiendo de las variedades, según lo indican Gómez y Rindermann (1995), citados por Vázquez *et al.*, (2003).

Debido a la gran cantidad de tipos encontrados a lo largo de la República Mexicana y no presentes en otros lugares del mundo, es considerado centro de origen del género *Capsicum*, especie *C. annuum* (Baltazar, 1997).

Los estudios taxonómicos coinciden en que son cinco las especies cultivadas en México: *Capsicum baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*, (Pickersgill, 1984; Pozo, 1991), de las cuales ésta es la más importante debido a que agrupa la mayor diversidad de chiles (Pickersgill, 1984). Esta especie

agrupa a la mayoría de los tipos cultivados en México, entre los que destacan: ancho, serrano, jalapeño, morrón, mirasol, pasilla, mulato; además, presenta la mayor variabilidad en cuanto a tamaño, forma, y color de los frutos, los cuales pueden variar de 1 a 30 cm. de longitud, con formas alargadas, cónicas o redondas y cuerpos gruesos macizos o aplanado. Los frutos presentan coloración verde o amarilla cuando están inmaduros; roja, amarilla, anaranjada y/o café en estado maduro (Muñoz y Pinto, 1966; Pozo, 1981; Laborde y Pozo, 1982).

Se consumen en estado fresco y deshidratados o secos, es utilizado como condimento debido a su principio picante, la capsicina que se localiza en la placenta de los frutos. Es uno de los vegetales mas importantes en México, en área sembrada y valor económico para exportación. La gran variación en climas y condiciones para su desarrollo que va del nivel del mar hasta los 2000 msnm permite tener producción tanto como para consumo local como para exportación durante todo el año (Baltazar, 1997).

### **Mejoramiento en chile**

El mejoramiento de chile (*Capsicum annuum* L.) tradicionalmente se ha realizado mediante esquemas de selección en los cuales, por lo general, se cruzan dos o cuando mucho cuatro progenitores, y la progenie de ellos se somete a endocria y selección continua hasta alcanzar la homocigosis total (Pozo y Ramírez, 1994; 1998). Estos esquemas de selección, conocidos como selección genealógica, método masivo y descendencia de una semilla (Márquez, 1991), se caracterizan por no recombinar, en cada generación, a los mejores individuos que se seleccionan.

Mediante selección recurrente es posible aumentar la frecuencia de genes favorables en caracteres cuantitativos en una población, sin pérdidas significativas de la variabilidad genética (Olmedo *et al.*, 1995), con la ventaja de que el límite de la selección no está determinada por el genotipo de una sola planta, sino por la combinación de genes distribuidos en un conjunto de plantas (Allard, 1960). Si bien la selección recurrente no es un método nuevo de mejoramiento genético, su aplicación en plantas autógamas no es frecuente (Ramage, 1977).

Se trabaja con poblaciones de amplia variabilidad genética, en las cuales es posible obtener genotipos recombinantes excelentes (Ramage, 1977). Se ha demostrado que este método de selección es efectivo para el mejoramiento de caracteres cuantitativos, tanto en plantas alógamas como en autógamas (Reysack *et al.*, 1993)

Es utilizado para mejorar características que son controladas por numerosos genes o cuyo efecto tiene una distribución cuantitativa (en lugar de binomial), o que son altamente afectados por el ambiente en el cual prospera el cultivo. La utilización de selección recurrente en especies autofecundadas depende de la facilidad con la que se puede manipular la polinización manual, debido a que ésta implica altos costos por la mano de obra necesaria y el tiempo que se ocupa. También se debe considerar la frecuencia de éxito en el proceso de la cruce manual y el número de semillas híbridas que se obtienen como producto de la cruce (Juárez, 2003).

Algunos mejoradores de Chile han explorado, eventualmente, esquemas poblacionales de mejoramiento por selección recurrente, combinados con esquemas tradicionales, que les ha permitido incrementar la eficiencia de sus programas, en la obtención de nuevas variedades (Pozo y Ramírez, 1994; Pozo y Ramírez, 1998).

La hibridación es por lo general siempre dentro de una especie, pero se han hecho cruza interespecíficas, sobre todo *C. annuum* por *C. chinense*, satisfactoriamente (Bosland, 1996). Las cruza en la especie *C. annuum* generalmente son dentro de tipos raciales, aunque es conocido que se practica el cruzamiento inter-racial, eventualmente, para mejorar caracteres específicos del fruto como tamaño en serrano y jalapeño; oquedad en jalapeño y grosor en pericarpio en ancho (Joshi *et al.*, 1991) para darle valor agregado en esos caracteres que se consideran muy importantes para incrementar el consumo tanto en fresco como industrializado.

### **Marcador Genético**

Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de una población y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos hasta la variación de un solo nucleótido. Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación y simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos de la planta.

En los análisis genómicos, se han utilizado varios tipos de marcadores genéticos: morfológicos, isoenzimas, proteínas y marcadores basados en ADN (Picca *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotípicos de fácil identificación visual (Ferreira y Grattapaglia, 1998), tal como color de flor, color de semilla, forma de semilla, etc. (Chalmers *et al.*, 1992). Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de interferencia epistática o ambiental limitaban su uso. La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos. Los primeros marcadores moleculares fueron desarrollados en los 70 y se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis. Pero esta técnica no es suficientemente polimórfica para diferenciar variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra (Pardo, 2003). Con la llegada de las técnicas modernas de la biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel del ADN, los llamados marcadores moleculares de ADN, que en general, pueden acelerar los programas de mejoramiento genético.

### **Marcadores moleculares**

Son regiones del ADN que presentan variación en su secuencia sin que, necesariamente, se aprecien cambios sustanciales en las funciones del organismo (Montaño, *et al.*, 2004)

Los marcadores moleculares de ADN aplicados indirecta o directamente al mejoramiento de plantas son RFLP, RAPD, SSR y AFLP (Andersen and Fairbanks, 1990; Powell *et al.*, 1996; Cregan *et al.*, 1999).

### **RFLP**

Este fue el primer marcador DNA (Botstein *et al.*, 1980), esta basado sobre la detección de variaciones en longitud de fragmentos de restricción de secciones de ADN específico entre individuos, a partir de la presencia o ausencia de sitios de restricción (Zidenga, 2004). Son de herencia dominante, usan una mínima cantidad de ADN y detectan un gran número de loci (50-100) por reacción (Becerra *et al.*, 2001).

### **RAPD**

Los marcadores generados por RAPD, son producto de una reacción de PCR utilizando primers cortos con una secuencia arbitraria y en condiciones de reacción de baja astringencia (Montaño *et al.*, 2004). La técnica es rápida, técnicamente fácil, y requiere poco material. Una de la principal ventaja de los análisis RAPD, en contraste a muchos otros protocolos basados en PCR, es que no requiere conocimiento previo de la biología molecular del organismo bajo estudio (Khan and Spoor, 2001).

### **Microsatélites o SSR**

Son secuencias repetidas de dos a cinco bases nucleotídicas. El número de repeticiones puede variar por lo que las diferencias o polimorfismo se detecta por una diferencia de tamaño. La técnica se basa en amplificación por PCR de la región que



conoce las secuencias repetidas. Para lograrlo se utilizan primers específicos de las regiones que flanquean la región donde se encuentran los microsatélites. Así, las diferencias son observadas por el tamaño de los productos de PCR, después de su separación en geles de electroforesis de alta resolución (Montaño *et al.*, 2004)

### **AFLP**

Por su alto grado de resolución, versatilidad y reproducibilidad se ha convertido en la herramienta molecular mas adecuada para establecer la huella genética de cualquier origen o complejidad, analizando simultáneamente muchos loci y detectando un mayor número de marcadores de ADN polimórfico que cualquier otro medio basado en la PCR. Además no requiere información previa de secuencia de ADN (Vos *et al.*, 1995).

El método de AFLP se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN genómico digerido con enzimas. En forma general, el ADN es incubado con dos endonucleasas o enzimas de restricción que producen fragmentos de diferentes tamaños. Para AFLP comúnmente se usan *EcoRI*, *AseI*, *Hind III*, *ApaI* y *PstI*, las cuales requieren de 6-8 bases en secuencia específica para poder hidrolizar, lo que genera fragmentos muy grandes debido a la baja frecuencia de estos sitios de corte. Para aumentar el número de cortes, por otro lado, la digestión se lleva acabo en combinación con otra enzima (*MseI* ó *TaqI*) que solamente necesita cuatro bases y que, por lo tanto, genera mayor número de fragmentos. En ambos casos, las enzimas tienen alta especificidad, garantizando la reproducibilidad del patrón de fragmentos de ADN.

A los fragmentos generados se les acopla unos “adaptadores” (oligonucleótidos sintéticos) de doble cadena, de 10-30pb, en los extremos utilizando la enzima T4 ADN ligasa. Estos “adaptadores” de secuencia conocida, son utilizados para amplificación por PCR, utilizando primers complementarios. Los primers contienen además una extensión de 1 a 3 nucleótidos en el extremo 3' y se marca radioactiva o fluorescente. Con estos primers, solamente se amplificarán los fragmentos que contengan los nucleótidos extras, además de aquellos del “adaptador”. Esto permite llevar a cabo la amplificación bajo condiciones astringentes, dándoles selectividad y reproducibilidad al método. Los productos amplificados son separados en un gel de poliacrilamida y el polimorfismo se identifica por la presencia o ausencia de una banda determinada (Vos *et al.*, 1995); citados por Montaña *et al.*, (2006).

En algunos casos el número de bandas es muy grande y no permite el análisis, o no es confiable. Por eso, se ha propuesto que lo ideal es amplificar entre 50 y 100 fragmentos por cada juego de primers (Bleas *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1995).

La única desventaja de AFLP es la dificultad para discernir co-dominancia. Es decir, un locus homocigoto (AA) y uno heterocigoto (Aa) pueden verse iguales, ya que A es amplificado y se aprecia una banda en ambos casos. Para poder distinguirlos se requiere un equipo altamente sensible y/o software especializado (Moen *et al.*, 2004c).

## **Aplicaciones de marcadores moleculares ADN**

Los marcadores moleculares han servido como base para la identificación de especies, de cepas, de híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, mapeo genómico con aplicaciones en genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular, genética conservacionista ( Liu y Cordes, 2004). En la detección de diferencias genéticas entre especies de planta estrechamente relacionada o diferencias entre poblaciones o variedades de una especie (Cervera *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1996; Loh *et al.*, 1999; Milbourne *et al.*, 1997; Paran, Aftergoot, and Shifris, 1998; Yamamoto *et al.* 1998).

## **Trabajos relacionados con marcadores moleculares en Chile**

En lo que respecta al desarrollo y utilización de marcadores moleculares en Chile.

García *et al.*, (2002) estimaron distancias genéticas entre líneas de Chile serrano usando marcadores RAPD y lo relacionaron con heterosis. Con RAPD produjeron 53 marcadores con solamente siete primers. Con la interpretación de los resultados encontraron que la correlación entre la matriz de distancias genéticas y la matriz de heterosis fue baja ( $r = 0.3281$ ) y no significativa, es decir, las distancias genéticas entre líneas parentales no está relacionada con la heterosis de sus híbridos.

Hernández *et al.*, (2001a) analizaron a través de análisis isoenzimas 10 poblaciones silvestres y tres domesticadas de Chile del noroeste de México, y encontraron que los niveles de variación genética fueron altos en todas las

poblaciones y de esta la mayor variación fue ligeramente dentro, que entre poblaciones. Estas poblaciones también variaron principalmente en morfología, germinación de semilla y en resistencia contra geminivirus PHV, un patógeno para el cual ninguna de las variantes comerciales es resistente (Hernández *et al.* 1998, 2001b, c).

Hernández *et al.*, (2004) estudiaron la estructura y la variación genética de quince poblaciones silvestres (*C. annuum* var. *glabriusculum*) comúnmente llamados chiles chiltepines y tres domesticadas de Chile (*Capsicum annuum*) de tipo serrano, jalapeño y morrón, con isoenzimas y RAPD. El análisis con isoenzimas indicó que el porcentaje de loci polimórficos (P) fue de 90.8 y 84.6 para las poblaciones silvestres y domesticadas, respectivamente, así mismo encontraron que ambas poblaciones mantienen niveles de variación genética similares, mientras que los valores de diversidad genética promedio, estimadas con RAPD (considerando todas las poblaciones) fue ligeramente mayor en las poblaciones silvestres a la encontrada en domesticadas. Sus resultados sugieren que el proceso de domesticación ha producido una erosión genética pequeña en los cultivares modernos de Chile.

Guzmán *et al.*, (2005) evaluaron la diversidad genética de 74 accesiones de Chile (*Capsicum* spp.) mediante AFLP. Las primeras 34 fueron colectadas en traspatios en la parte de Alta Verapaz, Guatemala y otras accesiones fueron seleccionadas de la colección nacional de germoplasma *ex situ* representando la diversidad de otras 12 partes de Guatemala. El total de muestras estudiadas quedó compuesta por 24 accesiones semicultivadas de [*C. annuum* var. *annuum* (Diente de Perro y Pico de gallina) y *C. annuum* var. *glabriusculum* (Chiltepe y Chiltepe Grande)], tres accesiones de *C. pubescens*, una accesión de *C. frutescens*, una de *C.*

*chinense*, y 45 accesiones de *C. annuum* cultivado. Mediante AFLP obtuvieron 68 bandas polimórficas con tres combinaciones de primers. Compararon la diversidad genética de accesiones de la colección nacional de banco de genes contra accesiones obtenidas de traspatios y encontraron poca diferencia en términos de la diversidad genética total (4%), lo que les permitió concluir que la diversidad genética que se encuentra en traspatios de Alta Verapaz es representativa del total de diversidad genética de *Capsicum* en Guatemala.

Oyama *et al.*, (2006), determinaron los niveles de variación genética y estructura genética de 15 poblaciones silvestres y tres domesticadas de *Capsicum annuum* mediante marcadores RAPD. Encontraron un 34.2% de polimorfismo en poblaciones silvestres y 34.7% en domesticadas. Considerando todas las poblaciones, la diversidad genética total en poblaciones silvestres fue ligeramente superior ( $H_T = 0.165$ ) que en domesticadas ( $H_T = 0.131$ ). El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que el total de la diversidad genética fue igualmente distribuido dentro (48.9 y 50.0%) y entre (50 y 51.1%) poblaciones en ambas muestras silvestres y domesticadas. Al comparar los dos tipos antes mencionados, se encontró una variación del 17.19%,  $p < 0.0001$ . Con los resultados obtenidos sugieren que la diferenciación puede estar asociada con la domesticación, así como por el diferente origen de pools de genes de las salvajes (Noroeste de México) y cultivadas (más probablemente Centro de México).

### III.- MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizó en el invernadero No. 8 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, durante el periodo comprendido de 2003 a 2005. Se llevo a cabo de la siguiente forma.

Se partió de semillas  $F_1$  obtenidas de un diseño de cruza dialélicas entre y dentro de los tipos raciales ancho (A), guajillo (G), jalapeño (J) y serrano (S). Se utilizaron cinco materiales de cada tipo racial (A, G, J y S) los cuales son variedades comerciales actualmente en uso y líneas experimentales del INIFAP.

Para formar las poblaciones se hizo recombinación de las progenies de la siguiente forma:

**Poblaciones intra-raciales.** El 20 de Febrero de 2004 se establecieron en campo las progenies dialélicas de cada tipo racial y al momento de la floración se eligieron cuatro de la misma raza y se hizo una recombinación entre ellos. De los cuales dos se utilizaron como hembra y dos como macho (Cuadro 3.1). Se emascularon botones florales de las plantas elegidas como hembra y enseguida se polinizaron en cada tipo racial. El amarre de los frutos se observó a los 6 días, los cuales cuando llegaron a la madurez fisiológica se cortaron, se secaron al sol durante tres días y después se les extrajo la semilla. Se utilizaron 150 semillas de cada uno de los dos materiales y se hizo un compuesto balanceado [De acuerdo con la técnica de recombinación denominada por Márquez (1994) cruza mesofraternales con mezcla de polen], se

obtuvo en total tres poblaciones intra-raciales cada una formada por 300 semillas (P-GXG, P-JXJ, y P-SXS).

**Poblaciones Inter-raciales.** El 03 de Abril de 2004 se establecieron en campo las progenies dialélicas de las cuatro razas mencionadas anteriormente, en la etapa de floración se eligieron cuatro materiales pero esta vez entre tipos raciales y se siguió la misma metodología mencionada anteriormente. Así también, se obtuvo una población en la que se involucraron todos los materiales inter-raciales donde intervinieron las cuatro razas y se hizo una recombinación de todos ellos, utilizándose la misma técnica (Cuadro 3.2). En total se obtuvieron cuatro poblaciones inter-raciales P-GXJ, P-GXS, P-JXS y la inter-racial macro P-AXGXJXS.

El manejo fue el mismo para todos los materiales. Se hicieron fertilizaciones foliares en cada una de las etapas fenológicas de la planta con grofol 20 30 10 (6gr/l). El riego se realizó cada 5-7 días dependiendo de las condiciones climáticas.

Se tuvieron problemas principalmente con cenicilla y se controló con Rali 40 w (2 gr/l), y con araña roja el producto que se utilizó fue Agrimec (1 ml/l).

**Cuadro 3.1** Progenitores utilizados para formar poblaciones intra-raciales.

No.	PROGENITORES	
	♀	♂
1	[Guajillo Zacatecas 1 (G)]	x [Guajillo Zacatecas 2 (G*)]
2	[Guajillo Zacatecas 2 (G)]	x [Guajillo INIFAP (G)]
3	[Guajillo San Luis (G)]	x [Guajillo INIFAP (G)]
4	[Guajillo INIFAP (G)]	x [Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]
5	[Don Pancho (J)]	x [Chijal 10-19 (J)]
6	[Chijal 10-19 (J)]	x [Don Benito (J)]
7	[Don Benito (J)]	x [Criollo Chiapas Largo (J)]
8	[Criollo Chiapas Largo (J)]	x [Chijal EB-13 (J)]
9	[Gigante Ébano (S)]	x [Chiser P8-60 (S)]
10	[Chiser P8-60 (S)]	x [Chiser 16-31 (S)]

## Continuación del Cuadro 3.1

11	[Chiser 16-31 (S)] x [Paraíso (S)]
12	[Paraíso (S)] x [Tampiqueño 74 (S)]

\*G=Guajillo

J=Jalapeño

S =Serrano

**Cuadro 3.2** Progenitores utilizados para formar poblaciones inter-raciales.

No.	PROGENITORES	
	♀	♂
1	[AP 99-6 (*A)]	x [Guajillo Zacatecas 1 (G)]
2	[AP 99-6 (A)]	x [Don Pancho (J)]
3	[AP 97-24 (A)]	x [Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]
4	[AP 97-24 (A)]	x [Chijal 10-19 (J)]
5	[Ancho Saltillo 79-4 (A)]	x [Don Benito (J)]
6	[Carmín 6-1 (A)]	x [Don Pancho (J)]
7	[AM 97-47 (A)]	x [Guajillo Zacatecas 1 (G)]
8	[AM 97-47 (A)]	x [Don Benito (J)]
9	[Guajillo Zacatecas 1 (G)]	x [Chijal 10-19 (J)]
10	[Guajillo Zacatecas 1 (G)]	x [Gigante Ébano (S)]
11	[Guajillo Zacatecas 2 (G)]	x [Chijal 10-19 (J)]
12	[Guajillo Zacatecas 2 (G)]	x [Chiser P8-60 (S)]
13	[Guajillo San Luis (G)]	x [Don Benito (J)]
14	[Guajillo San Luis (G)]	x [Chiser 16-31 (S)]
15	[Guajillo INIFAP (J)]	x [Criollo Chiapas Largo (J)]
16	[Guajillo INIFAP (J)]	x [Paraíso (S)]
17	[Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]	x [Don Pancho (J)]
18	[Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]	x [Chijal EB-13 (J)]
19	[Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]	x [Tampiqueño 74 (S)]
20	[Don Pancho (J)]	x [Gigante Ébano (S)]
21	[Chijal 10-19 (J)]	x [Chiser P8-60 (S)]
22	[Don Benito (J)]	x [Paraíso (S)]
23	[Criollo Chiapas Largo (J)]	x [Paraíso (S)]
24	[Chijal 10-19 (J)]	x [Gigante Ébano (S)]
25	[Chijal EB-13 (J)]	x [Tampiqueño 74 (S)]

\*A =Ancho

G =Guajillo

J =Jalapeño

S =Serrano



## **Caracterización de las poblaciones mediante marcadores genéticos moleculares**

El 01 de Agosto de 2005, del material establecido en charolas de polietileno, se tomó muestras para extracción de ADN para el corrimiento de AFLP de acuerdo con (Vos *et al.*, 1995). Con los datos de marcadores moleculares se estimaron el índice de diversidad (Powell *et al.*, 1996) y las distancias genéticas de las poblaciones como la describe (Nei y Li, 1979), la cual se utilizó para obtener un dendograma por el método UPGMA.

### **Extracción de ADN**

Se sembraron 300 semillas por población en charolas de polietileno de 200 cavidades, cuando las plantas tuvieron las primeras hojas verdaderas, se tomaron alrededor de 30 plantas de cada una y las muestras foliares de aproximadamente 0.4 – 0.6gr se colocaron en bolsas ziploc, se etiquetaron y se trasladaron en hielo al Centro de Biotecnología Genómica ubicado en Reynosa, Tamps. para la extracción de ADN.

El ADN se obtuvo de 4-5 hojas meristemáticas. La técnica utilizada fue la de Dellaporta *et al.*, (1983) con mínimas modificaciones.

Se puso a calentar un baño maría hasta 65 °C. Se adicionó 1 ml de Buffer de Extracción a tubos eppendorf. Se congeló de 0.2-0.4 gr de material vegetal en nitrógeno. Se molió este material hasta tener un polvo fino de color blancuzco, para ello se adicionó pequeñas cantidades de nitrógeno según conveniencia, se pasó este polvo a los tubos con Buffer extracción, se tapó y agitó firmemente unas cuatro ó cinco veces y se colocaron en el baño maría a 65 °C por 10 minutos, se sacaron y se les añadió 335µl de acetato de potasio 5M, se agitó suave por inversión y se

colocaron en hielo por 30 minutos. Después se llevaron a centrifugadora a 13,000 rpm por 12 minutos. Se filtró el sobrenadante proveniente de la centrifugación a través de una tela magitel estéril a tubos nuevos y después se les agregó 600µl de isopropanol enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se dejaron en refrigeración toda la noche, para potencializar la precipitación de ADN.

Al día siguiente los tubos eppendorf se colocaron en una centrífuga a 13,000 rpm durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y quedó en el fondo el empastillado (ADN), después se agregó 200 µl de solución para diluir, se agitó bien y a continuación se agregó 5µl de RNAsa a una concentración de 10 µl/ml, se agitó suave y se llevó a thermomixer (modelo 22331 serie S 35 020617) durante 40 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , después se le agregó 200 µl de fenol+cloroformo+ácido isoamílico (24:25:1), enseguida se llevó a vortex por 1 min, transcurrido el tiempo, se colocó de nuevo en una microcentrífuga a 13,000 rpm durante 8 minutos. Se eliminaron los residuos, se extrajo solo ADN con mucho cuidado y se pasaron a otros tubos nuevos a los que ya contenían 20 µl de acetato de sodio 3M y 200 µl de isopropanol, se agitó por inversión suave y se dejó por una hora en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo antes mencionado se centrifugó a las revoluciones y al tiempo anteriormente mencionados y enseguida se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 200µl de ETOH al 70% y se agitó, se volvió a centrifugar (este paso se repitió 3 veces). Después se colocó en thermomixer durante 10 minutos a  $45^{\circ}\text{C}$  para eliminar el 100% de ETOH y finalmente se le agregó 20 µl de TE 1X y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Marcadores genéticos moleculares

La detección de polimorfismo fue mediante AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) de acuerdo con (Vos *et. al.*, 1995). Se realizó en el Centro de Biotecnología Geonómica en Reynosa, Tamps.

Para ver la cantidad y calidad de ADN se corrieron las muestras en gel de agarosa al 1%, y se vio el gel en un transiluminador Cole Parmer.

### Digestión-ligación del ADN

La digestión se efectuó con muestras de ADN a una concentración de 170 ng/ $\mu$ l. Después de pruebas realizadas para ver el corte de las enzimas en geles de agarosa al 1%. Se colocó 3.3  $\mu$ l de ADN diluido de cada muestra en una placa para PCR bajo un arreglo previamente determinado, y se le agregaron 17.2  $\mu$ l de agua milli-q y 4.5  $\mu$ l de la mezcla compuesta con los reactivos (Cuadro 3.3) a cada reacción. Para efectuar la reacción se incubó a 37 °C por dos horas y media y 15 min a 70 °C para inactivar la enzima en un termociclador GeneAmp®PCR System 9700-032. Después se sacaron los tubos del termociclador y se almacenó a 4 °C.

**Cuadro 3.3** Mezcla para digestión.

Reactivo	Volumen
ADN (170 ng/ $\mu$ l)	3.3 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI (10 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
<i>Tru</i> 9I (10 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Buffer RL	2.5 $\mu$ l
Agua Milli-q	17.2 $\mu$ l
<b>Total 25.0 <math>\mu</math>l por reacción</b>	

Después de haber digerido el ADN, se realizó la ligación de los adaptadores. La secuencia del adaptador *EcoRI* fue 5'- CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-AATTGGTACGCAGTC-5'; y la del adaptador *MseI* fue 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5'. A los tubos que contenían la mezcla de digestión mencionada anteriormente, se les aplicó la mezcla de ligación. (Cuadro 3.4). Posteriormente se incubó a 20 °C por dos horas, en el termociclador. Por último se sacaron los tubos para PCR y se llevaron a refrigeración a -20 °C.

**Cuadro 3.4** Mezcla para ligación.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Adaptador <i>MseI</i>	1.0 µl
Adaptador <i>EcoRI</i>	1.0 µl
T4 ADN ligasa	1.0 µl
ATP (10mM)	1.0 µl
Buffer RL (10X)	1.0 µl
Agua Milli-q	5.0 µl
<b>Total 10.0 µl por reacción</b>	

#### **Pre-amplificación y amplificación selectiva**

Para la pre-amplificación se utilizaron los iniciadores *EcoRI*+A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') y *MseI*+C (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/C-3'). Se colocaron 2.5 µl de ADN digerido-ligado (diluido 1:60), mas 23.5 µl de la mezcla para la reacción de pre-amplificación (Cuadro 3.5).

**Cuadro 3.5** Mezcla para pre-amplificación.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
<i>Mse</i> I + C	1.5 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI + A	1.5 $\mu$ l
Buffer PCR (10X)	2.5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	2.0 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.20 $\mu$ l
Agua Milli-q	14.8 $\mu$ l
ADN de la ligación (Diluido 1:60)	2.5 $\mu$ l
<b>Total 25.0 <math>\mu</math>l por reacción</b>	

La pre-amplificación se efectuó en el termociclador bajo el siguiente programa (Cuadro 3.6).

**Cuadro 3.6** Programa para pre-amplificación.

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
	72	2.0
1	94	0.3
	56	1.0
	72	1.0
	94	0.3
20	56	1.0
	72	1.0
	94	0.3
1	4	$\infty$

La combinación de oligonucleotidos para la amplificación selectiva fue *EcoRI* + 3 (5'-GACTGCGTACCAATTC/ACA-3') y *MseI* + 3 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'). Se aplicaron 3.0 µl de ADN Pre-diluido, más 12.0 µl de mezcla para la reacción de amplificación (Cuadro 3.7).

**Cuadro 3.7** Mezcla para amplificación selectiva.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
<i>MseI</i> + 3	0.5 µl
<i>EcoRI</i> + 3	0.6 µl
Buffer PCR (10X)	1.5 µl
dNTPs (10 mM)	0.4 µl
Taq DNA polimerasa (5 U/ µl)	0.15 µl
Agua Milli-q	8.85 µl
ADN Pre-diluido	3.0 µl
<b>Total 15.0 µl por reacción.</b>	

Para las amplificaciones selectivas se utilizaron 4 combinaciones de iniciadores (Cuadro 3.8)

**Cuadro 3.8** Combinaciones de primer.

<b>No.</b>	<b>Combinaciones</b>	
1.	E-ACA	M-CTG
2.	E-AAG	M-CAG
3.	E-AAG	M-CAC
4.	E-AAG	M-CAA

## **Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Los vidrios que se utilizaron para entre ellos aplicar el gel, se lavaron primero con agua y jabón tres veces y después se les aplicó etanol absoluto al 70%. Al vidrio con muescas se le aplicó 1ml de diclorometilsilano a toda la superficie del vidrio, dentro de una cámara de extracción, después de la aplicación se dejaron pasar 10 minutos y con una toalla de papel sanitaria con etanol absoluto se limpió con cuidado el vidrio para quitar el exceso del producto. Al otro vidrio, este sin muescas, también dentro de una cámara de extracción se le aplicó una mezcla (950  $\mu$ l de etanol absoluto, 50  $\mu$ l de agua milli-q, 1 $\mu$ l de ácido acético, 2 $\mu$ l de bind silano) y se dejó cinco minutos, transcurrido este tiempo se limpió el exceso con etanol absoluto al 70%. Los vidrios se empalmaron y se colocaron unos separadores en medio y alrededor de los vidrios se colocaron unos sujetadores para que estos no se movieran y se les aplicó con la ayuda de una jeringa el gel el cual contenía 65 ml de acilamida al 6%, 400  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 40  $\mu$ l de temed, con mucho cuidado para evitar que se formaran burbujas; una vez terminada la aplicación se colocó un peine para formar pozos donde se iban a cargar las muestras y se dejó gelificar durante una hora veinte minutos.

Una vez transcurrido el tiempo antes mencionado el gel se recorrió en una cámara de electroforesis vertical (Owl®, modelo S3S) con amortiguador TBX (100 ml de TBE 10X + 900 ml de agua milli-q) hasta estabilizar la resistencia a 45 mA. Cabe mencionar que con una jeringa se aplicó amortiguador en la parte inferior de los vidrios evitando que se formaran burbujas y en la parte inferior con la punta de la jeringa se limpiaron los pozos para asegurarse que el ADN corriera bien.

A cada una de las muestras amplificadas (15 por población) contenidas en tubos para PCR se les agregó 5 µl de buffer de carga (formamida 98%, azul de bromofenol al 0.05%, xilen-cianol 0.05% y EDTA 10 mM) y después se desnaturalizaron a 94°C durante 4 minutos en el termociclador, pasado el tiempo se sacaron la muestras y se colocaron en hielo.

Ya con el gel precorrido, se aplicó 3 µl de marcador de peso molecular (25 bp DNA Ladder, Gibco®) en el primer pozo, con mucho cuidado para que no se pasara a los otros pozos, y después se empezó a aplicar 3.5 µl de cada muestra en cada uno de los pozos, hasta cargar las 105 muestras, 15 por población (esto se hizo por partes por el número de pozos de que se disponía). Finalmente la electroforesis se realizó a 2000 V por aproximadamente tres horas y media. Este mismo procedimiento se realizó en las cuatro combinaciones ACA/CTG, AAG/CAG, AAG/CAC, y AAG/CAA.

### **Revelado de los productos amplificados**

Lo primero que se hizo fue quitar los sujetadores y separadores y meter en la parte inferior una espátula y hacer presión con cuidado para separar los vidrios, el que contuvo el gel se colocó dentro de una charola con una mezcla (200 ml de ácido acético + 180 ml de agua desionizada- milli-q), la charola se colocó sobre un agitador marca orbit shaker, modelo 3520 durante 20 minutos. Después el gel se pasó a otra charola con agua desionizada-milli-q y se agitó durante dos minutos treinta segundos (este paso se hizo tres veces). Luego el gel se colocó en otra charola con (Silver nitrato + formaldehído + 2000 ml de agua milli-q) sobre el agitador durante treinta minutos. Enseguida se lavó con agua desionizada-milli-q durante 6 segundos. En otra charola se agregó (litro y medio de agua milli-q fría (4 °C) + un



litro de agua milli-q a temperatura ambiente + carbonato de sodio + una ampolleta de formaldehído + 400 µl de theosulfato) y se colocó el vidrio con el gel y se comenzó a agitar y cuando las bandas fueron visibles, se detuvo la reacción al aplicar (200 ml de ácido acético + 1800 ml de agua deshionizada-milli-q), a continuación se lavó durante dos minutos y medio, posteriormente se dejó secar el gel a temperatura ambiente durante dos días y transcurrido este tiempo se inició con la interpretación de las bandas.

### **Análisis genético**

El polimorfismo que se detectó en las cuatro combinaciones de iniciadores AFLP se determinó en base a la presencia o ausencia de bandas, donde el 1 se le asignó a la presencia y el 0 a la ausencia de estas. Una vez terminada la interpretación en el gel de acrilamida se hizo una base de datos basándose en 0 y 1 y está se utilizó para determinar el índice de diversidad mediante la formula  $ID = 1 - \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i^n$ ; en este caso, cada alelo individual se considera locus único y a su vez un fragmento de amplificación (Powell *et al.*, 1996). Mediante el programa Gendist se obtuvo las distancias genéticas entre las siete poblaciones (Nei y Li, 1979), usando el paquete de software PHYLIP versión 3.6 (Felsenstein, 2005). La matriz de distancias generadas se utilizó para producir un dendograma por el método UPGMA (Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas). Así también la matriz de ceros y unos fue usada para calcular el análisis de varianza molecular (AMOVA).

## IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Formación de poblaciones

En la formación de las poblaciones, siete se obtuvieron de forma satisfactoria. Tres intra-raciales P-SXS, P-JXJ, P-GXG y cuatro inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, y la inter-racial macro P-AXGXJXS. En las que se involucraron los tipos raciales ancho, las P-AXG y P-AXS estas no se pudieron formar porque al hacer las cruzas correspondientes estas no prendieron y en el caso de P-AXJ la cantidad de semilla obtenida fue poca, además se tuvo problemas con la germinación por lo que no fueron incluidas en este estudio.

Estos problemas también lo reporta Robledo (2005) al hacer cruzas inter-raciales que incluían progenitores del tipo racial ancho. La explicación pudiera deberse a problemas de adaptación de este tipo racial, particularmente con los factores climáticos locales.

### Análisis AFLP

Con las cuatro combinaciones de iniciadores AFLP se amplificaron un total de 203 productos de los cuales 134 fueron polimórficos, esto represento el 64.9 % (cuadro 4.1). Este porcentaje, es alto en comparación con los resultados obtenido con AFLP en 34 accesiones de Chile por Paran *et al.*, (1998) con 13% de bandas polimórficas. Sin embargo, en un trabajo realizado por Hernández *et al.*, (2004) en

poblaciones domesticadas las cuales pertenecieron a los chiles tipo serrano, jalapeño y morrón, reporta en el análisis con izarozimas 84.6% de loci polimórficos. Las diferencias encontradas en dichos trabajos posiblemente se debe a que en el primer trabajo se utilizaron cultivares comerciales de Chile, por eso fue bajo, mientras que en el segundo se trabajó con poblaciones y esto permitió que se encontrara mayor polimorfismo.

Cuando se trabaja a nivel molecular, el polimorfismo juega un papel muy importante, ya que está relacionado con la variabilidad.

**Cuadro 4.1** Productos amplificados por combinación mediante AFLP.

Combinación	Productos amplificados			Polimorfismo (%)
	Monomórficos	Polimórficos	Total	
AFLP <i>EcoRI/MseI</i>				
ACA/CTG	11	32	43	74.4
AAG/CAG	16	39	55	70.9
AAG/CAC	21	18	39	46.2
AAG/CAA	21	45	66	68.2
Total/Media	69	134	203	64.9

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ), tanto entre poblaciones como dentro de poblaciones, con un porcentaje de variación de 37% y 63% respectivamente (Cuadro 4.2). En un trabajo realizado por Hernández *et al.*, (1998) usando RAPD se encontró que en poblaciones domesticadas existe mayor variación dentro de poblaciones (51.12%) que entre poblaciones (48.88%). Esto indica una relación estrecha entre las siete poblaciones. Hernández *et al.*, (1989); Paran *et al.*, (1998) mencionan que materiales silvestres y domesticados de Chile mantienen bajos niveles de variación.

**Cuadro 4.2** Análisis de varianza molecular (AMOVA) de poblaciones de Chile mediante AFLP.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	P
Entre poblaciones	6	933.857	9.31823	37.00	< 0.0001
Dentro de Poblaciones	98	1555.200	15.86939	63.00	< 0.0001
Total	104	2489.057	25.18762		

Los resultados obtenidos en la población intra-racial P-SXS muestran que se obtuvo un índice de diversidad media de 0.33 el cual es igual al de la cruce inter-racial P-JXS, pero menor a la población P-GXS con un 0.36 (Cuadro 4.3)

Estos datos muestran que al formar poblaciones inter-raciales se puede ganar variabilidad, pero depende de los tipos raciales que se involucren, porque para el caso de la población inter-racial P-GXS hubo una ganancia de 3% de variabilidad, esto puede ser debido a que en el tipo racial guajillo no se ha hecho mucho mejoramiento, lo que ha permitido conservar mayor variabilidad, lo contrario sucede con P-JXS que debido a que en los tipos raciales jalapeño y serrano se ha hecho un poco más de mejoramiento, principalmente en este último, lo que no permitió que la población entre tipos (P-SXJ) fuera mayor a la población dentro de tipos (P-SXS).

Por otra parte P-JXJ tuvo un índice de diversidad de 0.28 el cual fue menor en comparación con las poblaciones inter-raciales P-JXS con 0.33 y para P-GXJ 0.32 habiendo una diferencia, en este caso la ganancia de variabilidad de 5 y 4% respectivamente al formar las poblaciones entre tipos (Cuadro 4.3).

Estos datos concuerdan con lo que reportó Baltazar (1997), en estudios mediante análisis isoenzimáticos. Indica que existe variación genética a nivel de

proteínas entre las especies *C. annuum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. chinense*, sin embargo observó poca variación dentro de los tipos de una misma especie. Dentro de *C. annuum* determino la diversidad genética por isoenzimas de los tipos serrano y jalapeño.

También Hernández *et al.* (2004), utilizando marcadores RAPD, reportaron que en poblaciones domesticadas que pertenecieron a los chile tipo serrano, Jalapeño y morrón, la diversidad genética en estas, es menor comparada con poblaciones silvestres de chile comúnmente llamados chiltepinos. Sus resultados sugieren que el proceso de domesticación ha producido una erosión genética pequeña en los cultivares modernos de chile.

La poca variación en estos dos tipos raciales fue lo que no permitió que al formarse poblaciones entre tipos raciales, se obtuvieran poblaciones con mayor variabilidad genética aun involucrando varios progenitores.

Lo contrario sucedió en la P-GXG quien en términos de variabilidad solo quedó por debajo de P-AXGXJXS con una diferencia de variación de 8%. Esto se pudo deber principalmente a que en el tipo racial guajillo es donde se ha hecho menor mejoramiento genético, por ende ha conservado su variabilidad (Ramiro, 1992: 2001).

Finalmente la que, de las siete que se analizaron mediante análisis AFLP mostró mayor variabilidad fue la inter-racial macro P-AXGXJXS con un índice de diversidad media de 0.48 que tiene una ganancia de variabilidad de 20% comparada con la población P-JXJ que tuvo menor variabilidad (Cuadro 4.3).

En la ganancia de variabilidad en esta población se atribuye que los que más aportaron fueron los progenitores del tipo racial guajillo, por lo antes mencionado, aquí también pudo haber influido el tipo racial ancho.

En las poblaciones obtenidas mediante cruzas entre tipos raciales fue donde mayor variabilidad se gano, con excepción de la que se formó mediante cruzas dentro de tipos raciales la cual fue P-GXG, sin embargo la variación genética generada en la mayoría de estas poblaciones, no fue alta, se asume que se debió a lo emparentados que están los tipos raciales.

**Cuadro 4.3** Índice de diversidad genética de poblaciones de Chile con base en la fórmula de (Powell *et al.*, 1996).

Poblaciones	Combinaciones				*I.D. media
	ACA/CTG	AAG/CAG	AAG/CAC	AAG/CAAA	
P-SXS	0.62	0.35	0.02	0.33	0.33
P-AXGXJXS	0.67	0.46	0.24	0.54	0.48
P-GXG	0.44	0.43	0.30	0.43	0.40
P-JXS	0.52	0.37	0.15	0.29	0.33
P-GXJ	0.37	0.40	0.16	0.36	0.32
P-JXJ	0.32	0.24	0.15	0.42	0.28
P-GXS	0.63	0.43	0.15	0.22	0.36

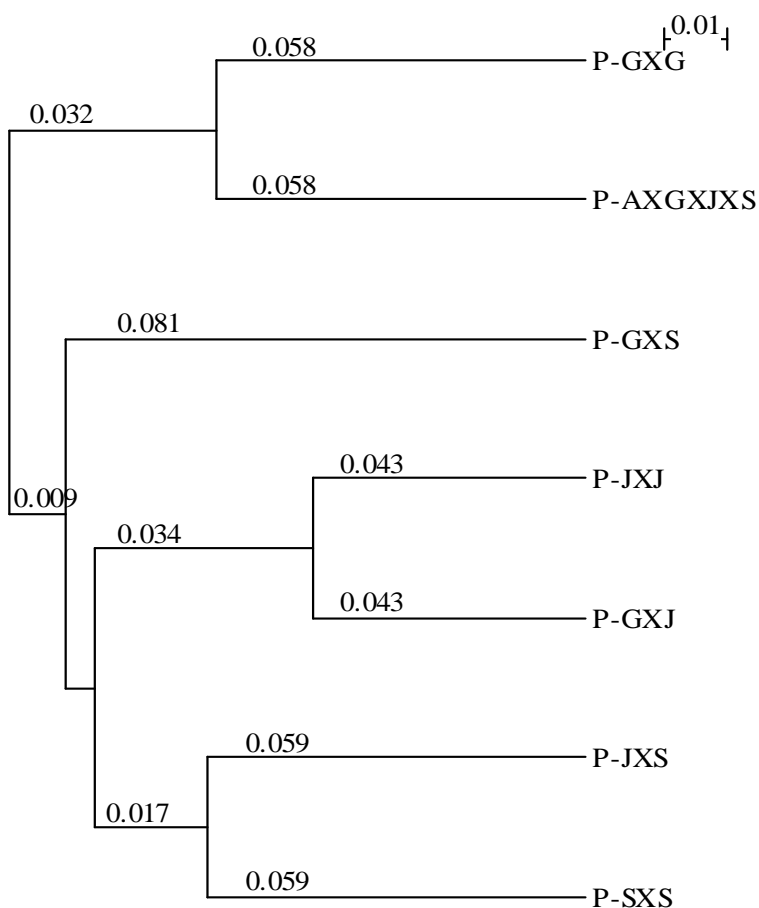
\* I.D. = Índice de diversidad.

Las relaciones genéticas entre poblaciones fueron calculadas utilizando la matriz de distancias genéticas (Nei y Li, 1979). Con estos datos se realizó un dendograma por el método UPGMA (Figura 1). Se encontró que se formaron dos grupos: en el primero se encontraron las poblaciones P-AXGXJXS y P-GXG en donde se encontraron las poblaciones más heterogéneas en términos de su índice de diversidad. El segundo grupo a su vez se dividió en tres subgrupos: en el primero se encontró la población P-GXS; en el segundo P-JXJ y P-GXJ y en el tercero P-JXS y P-SXS. En el segundo grupo las poblaciones fueron más homogéneas (Figura 1).

A manera de discusión general, y de acuerdo con la hipótesis planteada, se espera que la variabilidad se incremente en la medida en que las poblaciones se forman con material más divergente. Los resultados de esta investigación confirman que la mayor variabilidad se logra al recombinar en una población todos los tipos raciales (P-AXGXJXS), lo cual es un resultado esperado, de acuerdo con los estudios clásicos de cruzas varietales en maíz (Moll *et al.*, 1962; Moll *et al.*, 1965) y ofrece mejores expectativas del comportamiento de las poblaciones *per se* al incorporar alelos distintos para diversos caracteres de interés (Goodman *et al.*, 2000; Lellis *et al.*, 2001), así como de las líneas e híbridos formados a partir de ella (Cortez *et al.*, 1985).

El siguiente nivel de variabilidad en orden descendente era de esperarse en las cruzas inter-raciales (P-GXJ, P-GXS y P-JXS) y la más baja variabilidad dentro de los grupos raciales (P-GXG, P-JXJ, y P-SXS); sin embargo, el espectro de variabilidad observada en las poblaciones entre pares de tipos raciales (0.28 y 0.40) incluyó la variabilidad (0.32 a 0.36) de las poblaciones dentro de los grupos raciales (Cuadro 4.3). Considerando el promedio de ambos grupos de cruzas, se encontró que su diversidad es igual (0.34). La dispersión mostrada por el espectro de la diversidad en las poblaciones intra-raciales, puede ser explicada considerando que el tipo guajillo virtualmente no ha sido sometido a mejoramiento genético, ya que los materiales cultivados son variedades nativas y las variedades liberadas por diversas instituciones son simples accesiones con cierto grado de pureza y uniformidad genética (Ramiro, 1992; 2001). Por el contrario, los tipos jalapeño y serrano son los que más mejoramiento genético han recibido y probablemente han sufrido, por ello, algún grado de erosión genética, como lo aseguran Hernández *et al.*, (2004).

Independientemente de los sesgos que pudieran tener los resultados de esta investigación, derivados de la muestra germoplásmica en cada tipo racial y del nivel de mejoramiento a que estos materiales han sido sometidos, los resultados de esta investigación, aún cuando no se ajustan estrictamente a las hipótesis planteadas, dan evidencias empíricas de que la formación de poblaciones mediante la recombinación de dos o más tipos raciales es una estrategia importante para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente en Chile y coincide con resultados previamente obtenidos (Robledo, 2005; Robledo *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Dendrograma de disimilitudes genéticas entre poblaciones de Chile con base en el método UPGMA y datos AFLP.



## V.- CONCLUSIONES

Se formaron satisfactoriamente siete poblaciones. Tres intra-raciales P-SXS, P-JXJ, P-GXG y cuatro inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, P-AXGXJXS.

La variabilidad en las siete poblaciones, indicada por el índice de diversidad, varió de 0.28 a 0.48 y la mayor variabilidad se encontró en la población P-AXGXJXS seguida de P-GXG con un índice de diversidad de 0.48 y 0.40 respectivamente.

La formación de poblaciones mediante la recombinación de dos o más tipos raciales incrementa la variabilidad genética y las hace apropiadas para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente, dependiendo de los tipos raciales involucrados.

## **VI.- SUGERENCIAS**

Para la formación de futuras poblaciones, sería importante incluir progenitores criollos y/o silvestres de *C. annuum*, ya que según estudios previos (Paran *et al.*, 1998) tienen mayor variabilidad genética, combinados con tipos raciales como guajillos y jalapeños, para de este modo, al formar poblaciones mediante cruas entre tipos raciales podrá ser posible ganar un poco de mayor variabilidad, además de aprovechar algunas características que tienen los materiales al principio mencionados como son resistencia a plagas y enfermedades principalmente. Es recomendable seguir utilizando marcadores AFLP, por su poder discriminante.

## RESUMEN

A pesar del éxito logrado con la aplicación de esquemas de selección recurrente para el mejoramiento poblacional en especies alógamas como el maíz, las experiencias en autógamias han sido poco estudiadas. Es por esto que se utilizaron los marcadores moleculares AFLP para analizar la variabilidad genética entre poblaciones de Chile obtenidas mediante cruza intra e inter raciales de varios progenitores, con los tipos serrano, jalapeño, guajillo y ancho.

Se formaron tres poblaciones intra-raciales P-SXS, P-JXJ, P-GXG y cuatro inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, incluyendo la inter-racial macro P-AXGXJXS, las cuales se caracterizaron mediante marcadores moleculares. Con los datos generados por AFLP se determinó el índice de diversidad de cada una de las poblaciones, se encontró que P-AXGXJXS fue la que tuvo mayor variabilidad con 0.48, seguida de P-GXG con 0.40.

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ), tanto entre poblaciones como dentro de poblaciones, con un porcentaje de variación de 37% y 63% respectivamente. Esto indica una relación estrecha entre las siete poblaciones.

También se calcularon las distancias genéticas de las poblaciones, la cual se utilizó para producir un dendrograma por el método UPGMA. Se obtuvieron dos grupos: en el primero fue donde se encontraron las poblaciones más heterogéneas, P-AXGXJXS y P-GXG, el segundo grupo a su vez se dividió en tres subgrupos: en el primero se encontró la población P-GXS; en el segundo P-JXJ y P-GXJ y en el tercero P-JXS y P-SXS. En el segundo grupo las poblaciones fueron más homogéneas.

Con los datos obtenidos anteriormente se concluye que la formación de poblaciones mediante la recombinación de dos o más tipos raciales incrementa la variabilidad genética y las hace apropiadas para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente, dependiendo de los tipos raciales involucrados.

## VII.- LITERATURA CITADA

- Allard R. W. 1960. Principios de la Mejora Genética de las Plantas. Trad. del inglés por J. L. Montoya. Editorial Omega, México. 498 p.
- Anderson W. R., and D. J. Fairbanks. 1990. Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity* 6: 51-53.
- Baltazar B. 1997. Diversidad genética del cultivo de chile (*Capsicum* spp.) determinada por isoenzimas y RFLPs tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestre en su área de distribución. CONABIO proyecto No. G026. (<http://www.conabio.gob.mx/institución/cgi-bin/datos.cgi.?Letras=G&Numero=26>) Fecha de consulta. 04 de Noviembre de 2006.
- Becerra V., M Paredes, A Romero, y A Lavín. 2001. Diversidad bioquímica y molecular en frutillas chilenas (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) y su implicancia en el mejoramiento genético de la especie. *Agric. Téc.* 61: 413-428.
- Bosland P. W. 1996. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. P. 479-487.

- Botstein D., R. White, M Skolnik and R.W. Davis.1980. Construction of a genetic linkage map in human, using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Bleas M. J., S. A. De Grandis, H. Lee, J. T. Trevors. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 99-114.
- Castillo R. F. 2005. Construcción de un Mapa Genético de Girasol *Helianthus annuus* L. basado en marcadores AFLP's. Tesis de M. C. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- CONAPROCH. 2006. Chiles en el Mundo. Disponible en ([http://www.conaproch.org/chiles\\_en\\_el\\_mundo.htm](http://www.conaproch.org/chiles_en_el_mundo.htm)). Fecha de consulta. 27 de Noviembre de 2006.
- Cortez M. H., A. Rodríguez, M. Gutiérrez, J. Durón, R. Girón, y M. Oyervides. 1985. Evaluation of broad-base improved populations of maize (*Zea mays* L.). I. Cumulative gene effects and heterosis. Publication especial. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 43 p.
- Chalmers K. J., R. Waugh, J. I. Sprent, A. J. Simons, and W. Powell. 1992. Detection of genetic variation between and wit-hin populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.

- Cregan P. B., T. Jarvik, A. L. Bush, K. C. Shoemaker, K. G. Lark, A. L. Khaler, N. Kaya, T. T. Van Toai, D. G. Lohnes, J. Chung, and J. E. Specht. 1999. An integrated genetic map of the soybean genome. *Crop. Sci.* 39: 1469-1490.
- Dellaporta S. L., T. Woods, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21
- Falconer D. S. 1981. *Introducción a la genética cuantitativa*. CECSA, México. 430 p.
- Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.3. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Ferreira M., and D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen. 220 p.
- García B., F., G. E. Salinas, O. Pozo, H. Reyes, M. Ramírez, J. A. López, M. Aguirre, and O. Salazar. 2002. Estimation of genetic distances among green pepper (*Capsicum annuum*. L.) lines using RAPD markers and its relationship with heterosis. In: O. Pozo C. (Ed) *Proceedings. 16<sup>th</sup> International Pepper Conference*. Nov. 10-12. Tampico, Tams., México.
- Gill L. H. 2005. *Caracterización morfoagronómica y genética de germoplasma mejorado de soya [*Glycine max* (L.) Merr.]*. Tesis de M.C. Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Reynosa, Tamaulipas., México.

- Goodman M. M., J. Moreno, F. Castillo, R. N. Holley, and M. L. Carson. 2000. Using tropical maize germplasm for temperate breeding. *Maydica* 45: 221-234.
- Guzmán F. A., H. Ayala, C. Azurdia, M. C. Duque, y M. C. de Vicente. 2005. AFLP Assessment of Genetic Diversity of Capsicum Genetic Resources in Guatemala: Home Gardens as an Option for Conservation. *Crop Sci.* 45:363-370.
- Greenleaf W. H. 1986. Pepper breeding. In: Mark J. Bassett (ed.), *Breeding vegetable crops*. p 67-134. AVI, Wesport, CT.
- Hallauer A. R., and J. B. Miranda. 1988. *Quantitative Genetics in maize breeding*. Iowa State University, Ames, IA. 468 p.
- Hallauer A. R., W. A. Russell, and K. R. Lamkey. 1988. *Corn Breeding In: Corn and Corn Improvement*. p. 463-564. 3a. Ed. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Hernández V. S., R. G. Guevara, R. F. Rivera, C. Vázquez, and K. Oyama. 1998. Los parientes silvestres del chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 62: 171-181.
- Hernández V. S., R. Luna, and K. Oyama. 2001a. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Syst. Evol.* 226: 129-142.



- Hernández V. S., K. Oyama, and C. Vázquez. 2001b. Differentiation in seed germination among populations of *Capsicum annuum* along a latitudinal gradient in Mexico. *Plant Ecol.* 155: 245-257.
- Hernández V. S., R. G. Guevara, R. F. Rivera, and K. Oyama. 2001c. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus: presence of ADN viral and differentiation among populations. *Euphytica* 122: 31-36.
- Hernández V. S., R. Luna, C. Sánchez, A. G. Rodríguez, R. F. Rivera, R. G. Guevara, P. Sánchez, A. Casas, y K. Oyama. 2004. Variación genética y en la resistencia a virus en poblaciones silvestres de Chile (*Capsicum annuum*) silvestre de México. In: I. Torrez P., M. M. González, S. Montes, R. Bejarano, y R. G. Guevara. (Eds). Memoria de la Primera convención mundial de Chile. p. 447-453.
- Joshi S., P. C. Thakurg, T. S. Verma, and H. C. Verma. 1991. Intervarietal crossing of bell and hot pepper augments the hybrid seed yield. *Capsicum Newsletter* 10: 53-54.
- Joshi S. P., P. K. Ranjekar, and V. S. Gupta. 1999. Molecular marker in plant genome analysis. *Curr. Sci.* 77:230-240.
- Juárez G. P. 2003. Programa de mejoramiento genético de sandía en seminis. ([http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort03/Ponencia\\_03.pdf](http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort03/Ponencia_03.pdf)). Fecha de consulta. 15 de Octubre de 2006.

- Khan S and W. Spoor. 2001. Use of Molecular and Morphological Markers as a Quality Control in Plant Tissue Culture. Pak. J. Biol. Sci. 4: 479-482.
- Kumar L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. Biotechnology Advances 17:143-182.
- Laborde C. J. A. y C. O. Pozo. 1984. Presente y pasado del chile en México. Publicación especial No. 85. INIA. México. 80 p.
- Lellis M. C., J. Branco, y E. P. Gorgulho. 2001. Partial diallel cross between exotic and adapted maize populations evaluated in acid soil. Scientia Agricola 58: 313-319.
- Long, S. J. 1998. *Capsicum* y cultura: La Historia del chilli. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 203 p.
- Márquez S. F. 1991. Genotecnia Vegetal. Métodos, Teoría, Resultados. AGT Editor, México, D. F., México. Tomo II. 458 p.
- Martínez Z. G., I. Andrade, J. J. Hernández, M. Ramírez, y O. Pozo. 2004. Técnicas de cruzamiento en chile. In: I. Torrez, M. M. González, S. Montes, R. Bejarano, R. G. Guevara. (Eds). Memoria de la Primera convención mundial de chile. p. 29-36.
- Moen T., B. Hoyheim, H. Munck, L. Gómez. 2004c. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. Anim. Genet. 35: 81-92.

- Montaño P., E. Villalpando, A. Flores, F. Vargas. 2004. Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. *Panorama acuícola*. Vol. 10, No. 1. p. 18-22.
- Montaño P., E. Villalpando, F. Vargas. 2006. AFLP (amplified fragment length polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia. Revista de Ciencia y Tecnología de América*. Vol. 31. No. 8. p. 563-569
- Montes H., E. Heredia y J. A. Aguirre. 2004. Fenología del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Primera convención mundial del chile. p. 43-48.
- Moll R. H., S. Salhauana, and H. F. Robinson. 1962. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize. *Crop Sci.* 2: 197-198.
- Moll R. H., J. H. Lonquist, V. Fortuno, and E. C. Johnson. 1965. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics* 52: 139-144.
- Muñoz F., y I. B. Pinto. 1966. Taxonomía y distribución geográfica de los chiles cultivados de México. Folleto Misceláneo. No. 15. INIASAG. México.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Nyree J., C. Zerega, S. Mori, C. Lindqvist, Q. Zheng, and T. Motley. 2002. Using Amplified Length Polymorphisms (AFLP) to Identify Black Cohosh (*Actaea racemosa*). *Economic Botany* 56: 154-164.

- Liu Z. J., and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Olmedo A., E. M. Elias, and R.G. Cantrell. 1995. Recurrent selection for grain yield in durum wheat. *Crop Science* 35: 714-719.
- Orona C., V. Pecina, M. A. Rocha, V. M. Parga, O. Martínez, I. H. Almeida. 2004. Caracterización de variedades y líneas élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR. *Revista internacional de botánica experimental ΦYTON*. p. 289-300.
- Orlando Y, B. 2002. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Oyama K., S. Hernández, C. Sánchez, A. González, P. Sánchez, J. A. Garzón, y A. Casas. 2006. Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 553-562.
- Paran I., E. Aftergood, and C. Shifriss. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-174.
- Pardo G. M. 2003. Identificación genética de componentes biológicos en alimentos. *Sustrai: revista agropresquera*. No. 64. p. 69-71.
- Picca A. M. Helguera, N. Salomón, y A. Carrera. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal.

([http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2\\_cap4.pdf](http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap4.pdf)). Fecha de consulta. 27 de Noviembre de 2006.

Pickersgill B., B. Jeiser y J. McNeill. 1979. Numerical taxonomic studies on variations and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes, J. G., R. N. Lester and A. D. Selding (Ed.) The biology and taxonomy of Solanaceae. Academic Press. N. Y. pp. 679-700.

Pickersgill B. 1984. Migrations of chili peppers, *Capsicum* spp. in the Americas In: Stone D. (Ed). Papers of Peabody Museum of Archeology. Vol 76. Harvard University Press. pp. 105-123.

Powell W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanaffey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparasion of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.

Pozo C. O. 1981. Descripción de tipos y cultivares de chile (*Capsicum* spp.) en México. Folleto técnico num. 77. INIA-SARH. 40p.

Pozo C. O., H. S. Montes, y J. E. Redondo. 1991. El chile (*Capsicum* spp.) en: Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. México. pp. 217-238.

Pozo C., O. y M. Ramírez. 1994. Gigante Ébano y Paraíso. Nuevas variedades de chile serrano en México. Folleto Técnico No. 10. CESTAM-CIRNE-INIFAP.

- Pozo C., O. y M. Ramírez. 1998. Don Pancho y Don Benito. Cultivares de chile jalapeño para el trópico húmedo de México. Folleto Técnico No. 15. CESTAM-CIRNE-INIFAP.
- Prince J. P., E. Pochard, and S. D. Tanksley. 1992. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome* 36: 404-417.
- Ramage R. T. 1977. Varietal improvement of wheat through male sterile facilitated recurrent selection. ASPAC. Tech. Bull. No. 37. Republic of China. 6 p.
- Ramiro C. A. 1986. Cruzamiento artificial en chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de M. C. Colegio de postgraduados, Montecillo, México.
- Ramiro C. A. 1992. VR-91 nueva variedad de chile mirasol o guajillo. Folleto Técnico #2. Campo Experimental Palma de la Cruz, San Luis Potosí, México.
- Ramiro C. A. 2001. Guajillo San Luis y Guajillo INIFAP nuevas variedades de chile mirasol para Centro-Norte de México. Folleto Técnico #14. Campo Experimental Palma de la Cruz, San Luis Potosí, México.
- Ramiro C., C. Jasso y M. Martínez. 2004. Evaluación de tres híbridos y dos líneas avanzadas de chile serrano (*Capsicum annum* L.) en San Luis Potosí, México. In: I. Torrez., M. M. González, S. Montes, R. Bejarano, R. G. Guevara. (Eds). Memoria de la Primera Convención Mundial del Chile. p.7-13.

- Reysack, J. J., D. D. Stuthman, and R. E. Stucker. 1993. Recurrent selection in oat: stability of yield and changes in unselected traits. *Crop Sci.* 33: 919-924.
- Robledo G. E. 2005. Potencial genético de cruzas inter-raciales en el mejoramiento de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. 66p.
- Robledo G. E., G. Martínez, M. Ramírez, A. de la Rosa, J. A. R. Dorantes. 2005. Cruzas inter-raciales en chile: ¿promiscuidad genética o estrategia de mejoramiento?. Memoria, XIX Congreso Nacional de Citogenética SOMEFI, A. C., El cerrillo, Toluca, México. 19-24 sept. P262.
- Smith O. S., J. S. Smith, S. L. Bowen, R. A. Tenborg, and S. R. Wall. 1990. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F<sub>1</sub> grain yield, grain yield heterosis and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 80: 833-840.
- Vázquez C., M. L. Cárdenas, y M. E. Morales. 2003. Callo *in vitro* de chile morrón (*Capsicum annuum* L.). *Revista Salud Pública y Nutrición.* Edición Especial. No. 3.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

Williams J. G., A. R. Kubelk, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey.1990.

DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.

Zidenga T. 2004. DNA-based methods in sorghum diversity studies and improvement. ISB News Report. Plant Biotechnology Center. Ohio State University.

(<http://www.isb.vt.edu/news/2004/news04.mar.html#mar0404>). Fecha de consulta. 24 de Noviembre de 2006.



**Formación de poblaciones de chile (*Capsicum annuum* L.) para selección recurrente y caracterización mediante marcadores AFLP**

**Formation of populations of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) for recurrent selection and characterization by means of markers AFLP**

**Reinaldo Méndez Aguilar<sup>1\*</sup>, Gaspar Martínez Zambrano<sup>1</sup>, Moisés Ramírez Meraz<sup>2</sup>, Netzahualcoyotl Mayek Pérez<sup>3</sup>, Alfonso López Benitez<sup>1</sup>, Humberto de León Castillo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP 25315. Correo electrónico: m\_reinaldo@yahoo.com <sup>2</sup>Campo Experimental Sur de Tamaulipas.

<sup>3</sup>Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

\* Autor para correspondencia

---

**RESUMEN**

La diversidad genética de siete poblaciones formadas mediante cruza intra e inter-raciales, para ser utilizadas en un programa de mejoramiento, fueron evaluadas con marcadores AFLP. Se utilizaron materiales de los tipos raciales ancho, guajillo, serrano y jalapeño. Se partió de 37 cruza progenitoras dialélicas formadas en la UAAAN, en Buenavista, Saltillo, Coahuila. La parte molecular se realizó en el CBG-IPN, en Reynosa, Tamaulipas. En el análisis obtenido con cuatro combinaciones de primer AFLP se obtuvo 64.9% de polimorfismo, lo que permitió la discriminación de las siete poblaciones examinadas. Así también se determinó el índice de diversidad (ID) para analizar la variabilidad genética de cada una de las poblaciones, encontrándose que la población P-AXGXJXS fue la que tuvo mayor ID con 0.48. Se obtuvo un dendograma por el método UPGMA encontrándose diferencias en la forma de agrupamiento de las poblaciones. Con los datos obtenidos anteriormente se concluye que la formación de dos o más tipos raciales incrementa la variabilidad genética y las hace apropiadas para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente, dependiendo de los tipos raciales involucrados.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, Poblaciones, AFLP.

**ABSTRACT**

The genetic diversity of seven populations formed by means crosses intra and inter-raciales, to be used in an improvement program, were evaluated with markers AFLP. Materials of the racial types ancho, guajillo, serrano and jalapeño were used. It was split 37 crosses diallelic parents formed at UAAAN, in Buenavista, Saltillo, Coahuila. The molecular part was realized in the CBG-IPN, in Reynosa, Tamaulipas. In the analyses obtained with four AFLP primer combinations 64.9% of polymorphism were obtained, which allowed the discrimination of the seven examined populations. So too was determined the diversity index (DI) for to analyze the genetic diversity of each one of the populations, being that the population P-AXGXJXS was the one that it had greater DI with 0.48. Dendogram by method UPGMA was

**obtained being differences in the form of group of the populations. With the obtained data previously one concludes that the formation of two or more racial types increases the genetic variability and makes appropriate to make population improvement by recurrent selection, depending on the involved racial types.**

**Index words:** *Capsicum annuum*, Populations, AFLP.

## INTRODUCCIÓN

El mejoramiento de Chile se ha realizado mediante esquemas de selección conocidos como: selección genealógica, método masivo y descendencia de una semilla (Márquez, 1991), que utilizan por lo general dos progenitores y su progenie se somete a endocria y selección continua, hasta que alcanzan homocigosis total.

Sin embargo, la atención también ha sido puesta sobre esquemas de selección utilizados en especies alógamas, la selección recurrente. Con este método se seleccionan y recombinan de forma cíclica, aquellas plantas con expresiones fenotípicamente superiores, permite aumentar la frecuencia de genes favorables en caracteres cuantitativos en una población, sin pérdida significativa de variabilidad genética.

A pesar del éxito logrado con la aplicación de esquemas de selección recurrente para el mejoramiento poblacional en especies alógamas como el maíz (Hallauer *et al.*, 1988), las experiencias en autógamias han sido poco estudiadas, se tiene poca información sobre poblaciones caracterizadas, ya sea fenotípicamente o a nivel molecular. Es por esto que se utilizara los marcadores moleculares AFLP para analizar la variabilidad genética en poblaciones de Chile obtenidas mediante cruza intra e inter raciales de varios progenitores, con los tipos serrano, jalapeño, guajillo y ancho.

Los objetivos de este estudio fueron formar poblaciones de amplia base genética aprovechables en un programa de mejoramiento por selección recurrente mediante cruza intra e inter-raciales y la caracterización de estas mediante marcadores AFLP; la hipótesis que se plantea es que las poblaciones formadas con la recombinación de varios progenitores entre tipos raciales, representan una mejor estrategia de mejoramiento con base en la variabilidad y diversidad genética acumulada, que las formadas dentro de tipos raciales.

Se han realizado estudios con marcadores moleculares para estudiar variación genética en varios importantes cultivos: *Lycopersicon* (Millar and Tanksley, 1990a), *solanum* (Gebhardt *et al.*, 1989; Orona *et al.*, 2004), and *Capsicum* (Loaiza *et al.*, 1989; Zewdie and Zeven, 1997; Paran *et al.*, 1998; Guzmán *et al.*, 2005).

## MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizo en el invernadero No. 8 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Saltillo, Coahuila, durante el periodo comprendido de 2003 a 2005.

Se partió de semillas F1 obtenidas de un diseño de cruzas dialélicas entre y dentro de los tipos raciales ancho (A), guajillo (G), jalapeño (J) y serrano (S). Se utilizaron cinco materiales de cada tipo racial (A, G, J y S) los cuales son variedades comerciales actualmente en uso y líneas experimentales proporcionadas por el INIFAP.

**Poblaciones intra-raciales.** El 20 de Febrero de 2004 se establecieron en campo las progenies dialélicas de cada tipo racial y al momento de la floración se eligieron cuatro de la misma raza y se

hizo una recombinación entre ellos, de los cuales dos se utilizaron como hembra y dos como macho (Cuadro 1). Se emascularon botones florales de las plantas elegidas como hembra y enseguida se polinizaron en cada tipo racial. El amarre de los frutos se observó a los 6 días, los cuales cuando llegaron a la madurez fisiológica se cortaron, se secaron al sol durante tres días y después se les extrajo la semilla. Se utilizaron 150 semillas de cada uno de los dos materiales y se hizo un compuesto balanceado, de acuerdo con la técnica de recombinación denominada por Márquez (1994) cruzas mezofraternales con mezcla de polen, se obtuvo en total tres poblaciones intra-raciales cada una formada por 300 semillas (P-GXG, P-JXJ, y P-SXS).

**Poblaciones inter-raciales.** El 03 de Abril de 2004 se establecieron en campo las progenies dialélicas de las cuatro razas mencionadas anteriormente, en la etapa de floración se eligieron cuatro materiales pero esta vez entre tipos raciales y se siguió la misma metodología mencionada anteriormente. Así también, se obtuvo una población-macro en la que se involucraron todos los materiales inter-raciales donde intervinieron las cuatro razas y se hizo una recombinación de todos ellos, utilizándose la misma técnica (Cuadro 2). En total se obtuvieron cuatro poblaciones inter-raciales P-GXJ, P-GXS, P-JXS incluyendo la inter-racial macro P-AXGXJS.

**Cuadro 1.** Progenitores utilizados para formar poblaciones intra-raciales.

No.	PROGENITORES	
	♀	♂
1	[Guajillo Zacatecas 1 (G)]	x [Guajillo Zacatecas 2 (G*)]
2	[Guajillo Zacatecas 2 (G)]	x [Guajillo INIFAP (G)]
3	[Guajillo San Luis (G)]	x [Guajillo INIFAP (G)]
4	[Guajillo INIFAP (G)]	x [Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]
5	[Don Pancho (J)]	x [Chijal 10-19 (J)]
6	[Chijal 10-19 (J)]	x [Don Benito (J)]
7	[Don Benito (J)]	x [Criollo Chiapas Largo (J)]
8	[Criollo Chiapas Largo (J)]	x [Chijal EB-13 (J)]
9	[Gigante Ébano (S)]	x [Chiser P8-60 (S)]
10	[Chiser P8-60 (S)]	x [Chiser 16-31 (S)]
11	[Chiser 16-31 (S)]	x [Paraíso (S)]
12	[Paraíso (S)]	x [Tampiqueño 74 (S)]

\*G=Guajillo

J=Jalapeño

S =serrano

**Cuadro 2.** Progenitores utilizados para formar poblaciones inter-raciales.

No.	PROGENITORES	
	♀	♂
1	[AP 99-6 (*A)]	x [Guajillo Zacatecas 1 (G)]
2	[AP 99-6 (A)]	x [Don Pancho (J)]
3	[AP 97-24 (A)]	x [Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]
4	[AP 97-24 (A)]	x [Chijal 10-19 (J)]
5	[Ancho Saltillo 79-4 (A)]	x [Don Benito (J)]
6	[Carmín 6-1 (A)]	x [Don Pancho (J)]
7	[AM 97-47 (A)]	x [Guajillo Zacatecas 1 (G)]
8	[AM 97-47 (A)]	x [Don Benito (J)]
9	[Guajillo Zacatecas 1 (G)]	x [Chijal 10-19 (J)]
10	[Guajillo Zacatecas 1 (G)]	x [Gigante Ébano (S)]
11	[Guajillo Zacatecas 2 (G)]	x [Chijal 10-19 (J)]
12	[Guajillo Zacatecas 2 (G)]	x [Chiser P8-60 (S)]
13	[Guajillo San Luis (G)]	x [Don Benito (J)]
14	[Guajillo San Luis (G)]	x [Chiser 16-31 (S)]
15	[Guajillo INIFAP (J)]	x [Criollo Chiapas Largo (J)]
16	[Guajillo INIFAP (J)]	x [Paraíso (S)]
17	[Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]	x [Don Pancho (J)]
18	[Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]	x [Chijal EB-13 (J)]
19	[Guajillo-Puya-Salitrillo (G)]	x [Tampiqueño 74 (S)]
20	[Don Pancho (J)]	x [Gigante Ébano (S)]
21	[Chijal 10-19 (J)]	x [Chiser P8-60 (S)]
22	[Don Benito (J)]	x [Paraíso (S)]
23	[Criollo Chiapas Largo (J)]	x [Paraíso (S)]
24	[Chijal 10-19 (J)]	x [Gigante Ébano (S)]
25	[Chijal EB-13 (J)]	x [Tampiqueño 74 (S)]

\*A = Ancho                      G=Guajillo                      J=Jalapeño                      S =serrano

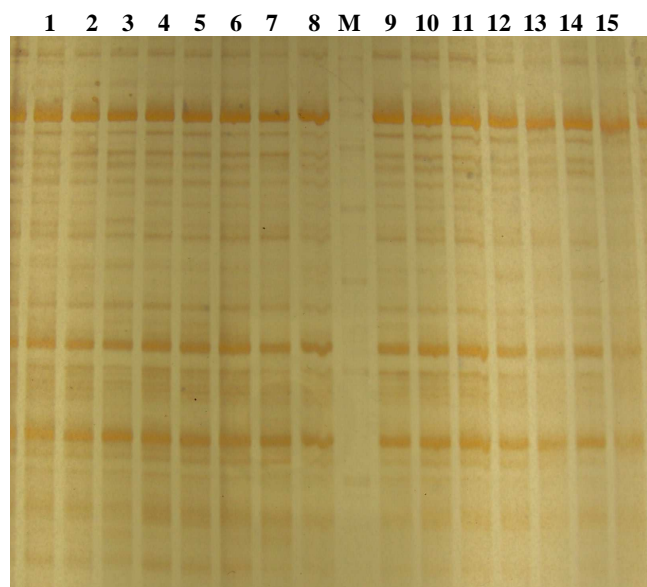
### Aislamiento de ADN

La parte molecular se desarrollo en el laboratorio vegetal II del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN), en Reynosa, Tamaulipas. Para la extracción de ADN se utilizaron 15 plantas jóvenes por población, se utilizo la metodología de Dellaporta *et al.*, (1983) con mínimas modificaciones. Este material biológico se lavo con agua destilada estéril y posteriormente se congelo a  $-xx^{\circ}\text{C}$ , El ADN fue cuantificado en geles de agarosa al 1%, con uso de una concentración conocida de ADN del fago en un transiluminador marca Cole Parmer.

### Análisis AFLP

La detección de polimorfismo fue mediante AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) de acuerdo con (Vos *et al.*, 1995). La digestión se efectuó con muestras de ADN a una concentración de 170 ng/  $\mu\text{l}$ . En un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  se mezclaron 3.3 ADN, 1  $\mu\text{l}$  *EcoRI*, 1  $\mu\text{l}$  *Tru9I*, 2.5  $\mu\text{l}$  Buffer RL y 17.2  $\mu\text{l}$  agua milli-q. Para efectuar la reacción se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  por dos horas y media y 15 min a 70  $^{\circ}\text{C}$  para inactivar las enzimas de restricción en un termociclador GeneAmp®PCR System 9700-032. A los productos de restricción, se agrego la mezcla de ligación de los adaptadores *EcoRI* 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-AATTGGTACGCAGTC-5'; y la del adaptador

*MseI* 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5'. En un volumen final de 10 µl la mezcla de ligación contenía 1 µl Adaptador *MseI*, 1 µl Adaptador *EcoRI*, 1 µl T4 ADN ligasa, 1 µl ATP (mM), 1 µl Buffer RL (10X) y 5.0 µl agua milli-q. Se incubó a 20 °C por dos horas en el termociclador. Para la pre-amplificación se utilizaron los iniciadores *EcoRI*+A (5'-AGACTGCGTACCAATTC/A-3') y *MseI*+C (5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/C-3'). Se colocaron 2.5 µl de ADN digerido-ligado (diluido 1:60), más 23.5 µl de la mezcla para la reacción de pre-amplificación la cual contenía 1.5 µl *MseI*+C, 1.5 µl *EcoRI*+A, 2.5 µl Buffer PCR (10X), 2.0 µl dNTPs (10 mM), 0.20 µl Taq DNA polimerasa (5 U/µl) y 14.8 µl de agua milli-q. Se efectuó bajo el siguiente programa: 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 56 °C, 60 s a 72 °C. La combinación de oligonucleotidos para la amplificación selectiva fue *EcoRI* + 3 (5'-GACTGCGTACCAATTC/ACA-3') y *MseI* + 3 (5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'). Se aplicaron 3.0 µl de ADN preamplificado-diluido, más 12.0 µl de mezcla para la reacción de amplificación (0.6 µl *EcoRI*, 0.5 µl *MseI*, 1.5 µl Buffer PCR (10X), 0.4 µl dNTPs (10mM), 0.15 µl Taq DNA polimerasa (5 U/µl) y 8.85 µl agua milli-q). Se utilizaron cuatro combinaciones de primers (*EcoRI/MseI*) ACA/CTG, AAG/CAG, AAG/CAC y AAG/CAA. Finalmente los productos del PCR fueron desnaturalizados mediante incubación 4 min a 94 °C y colocados en hielo antes de ser cargados en geles de acrilamida al 6 % y separados en una cámara de electroforesis vertical marca Owl®, modelo S3S durante 2 hr 30 min a 2000 V.



**Figura 1.** Amplificación mediante la técnica de AFLP, a partir del DNA de 15 muestras de Chile (*Capsicum annuum* L.), obtenidos con la combinación ACA/CTG, M = Marcador.

### **Análisis de datos**

El polimorfismo que se detectó en las cuatro combinaciones de iniciadores AFLP se determinó en base a la presencia o ausencia de bandas, donde el 1 se le asignó a la presencia y el 0 a la ausencia de estas.

Una vez terminada la interpretación en el gel de acrilamida se hizo una base de datos basándose en 0 y 1 y esta se utilizó para determinar el índice de diversidad mediante la fórmula  $ID = 1 - \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i^a$ ; en este caso, cada alelo individual se considera un locus único y a su vez un fragmento de amplificación (Powell *et al.*, 1996).

Mediante el programa Gendist se obtuvo las distancias genéticas entre las siete poblaciones (Nei y Li, 1979), usando el paquete de software PHYLIP Versión 3.6 (Felsenstein, 2005). La matriz de distancias generadas se utilizó para producir un dendrograma por el método UPGMA (Método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas) ver Figura 2. Así también la matriz de ceros y unos fue usada para calcular el análisis de varianza molecular (AMOVA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Formación de poblaciones

En la formación de las poblaciones, siete se obtuvieron de forma satisfactoria. Tres intra-raciales P-SXS, P-JXJ, P-GXG y cuatro inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, incluyendo la inter-racial macro P-AXGXJXS. En las que se involucraron los tipos raciales ancho, las P-AXG y P-AXS estas no se pudieron formar porque al hacer las cruzas correspondientes estas no prendieron y en el caso de P-AXJ la cantidad de semilla obtenida fue poca, además se tuvo problemas con la germinación por lo que no fueron incluidas en este estudio.

Estos problemas también se presentaron en el trabajo de investigación de Robledo (2005) al hacer cruzas inter-raciales que incluían progenitores del tipo racial ancho. La explicación pudiera deberse a problemas de adaptación de este tipo racial, particularmente con los factores climáticos locales.

### Análisis AFLP

Con las cuatro combinaciones de iniciadores AFLP se amplificaron un total de 203 productos a partir de cuatro combinaciones, de los cuales 134 fueron polimórficos, esto representó el 64.9 % (cuadro 3). Este porcentaje de polimorfismo es alto en comparación con los resultados obtenidos por Paran *et al.*, (1998) quien trabajando con AFLP en 34 accesiones de Chile encontró 13% de bandas polimórficas. Sin embargo, en un trabajo realizado por Hernández *et al.*, (2004) en poblaciones domesticadas las cuales pertenecieron a los chiles tipo serrano, jalapeño y morrón, reporta en el análisis con isoenzimas 84.6% de loci polimórficos. Las diferencias encontradas en dichos trabajos posiblemente se deben a que en el primero se utilizaron accesiones estrechamente relacionadas, por eso fue bajo, mientras que en el segundo se trabajó con poblaciones y esto permitió que se encontrara mayor polimorfismo. Cuando se trabaja a nivel molecular, el polimorfismo juega un papel muy importante, ya que está relacionado con la variabilidad.

**Cuadro 3.** Productos amplificados por combinación mediante AFLP.

Combinación AFLP <i>EcoRI/MseI</i>	Productos amplificados			Polimorfismo (%)
	Monomórficos	Polimórficos	Total	
ACA/CTG	11	32	43	74.4
AAG/CAG	16	39	55	70.9
AAG/CAC	21	18	39	46.2
AAG/CAA	21	45	66	68.2
Total/Media	69	134	203	64.9

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) se detectó diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ), tanto entre poblaciones como dentro de poblaciones, con un porcentaje de variación de 37% y 63% respectivamente (Cuadro 4). Esto concuerda con Hernández *et al.*, (1998) quien, usando RAPD encontró que en poblaciones domesticadas existe mayor variación dentro de poblaciones (51.12%) que entre poblaciones (48.88%). Esto indica una relación estrecha entre las siete poblaciones. Loaiza *et al.*, (1989); Paran *et al.*, (1998) mencionan que materiales silvestres y domesticados de Chile mantienen bajos niveles de variación.

**Cuadro 4.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) de poblaciones de Chile mediante AFLP.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	P
Entre poblaciones	6	933.857	9.31823	37.00	< 0.0001
Dentro de Poblaciones	98	1555.200	15.86939	63.00	< 0.0001
Total	104	2489.057	25.18762		

Los resultados obtenidos en la población intra-racial P-SXS muestran que se obtuvo un índice de diversidad media de 0.33 el cual es igual al de la cruce inter-racial P-JXS, pero menor a la población P-GXS con un 0.36, teniendo esta ganancia de 3%. P-JXJ tuvo un índice de diversidad de 0.28 el cual fue menor en comparación con las poblaciones inter-raciales P-JXS con 0.33 y para P-GXJ 0.32, en este caso se obtuvo ganancia de variabilidad de 5 y 4% respectivamente al formar las poblaciones entre tipos.

La excepción de las poblaciones intra-raciales se encontró en P-GXG quien en términos de variabilidad solo quedó por debajo de P-AXGXJXS con una diferencia de variación de 8%.

La que de las siete que se analizaron mediante análisis AFLP mostró mayor variabilidad fue la inter-racial macro P-AXGXJXS con un índice de diversidad media de 0.48 quien tiene una ganancia de variabilidad de 18% comparada con la población P-JXJ quien tuvo menor variabilidad (Cuadro 5).

A manera de discusión general sobre índice de diversidad, y de acuerdo con las hipótesis planteadas, de las cuales se espera que la variabilidad se incremente en la medida en que las poblaciones se forman con material más divergente, los resultados de esta investigación confirman que la mayor variabilidad se logra al recombinar en una población todos los tipos raciales (P-AXGXJXS), lo cual es un resultado esperado, de acuerdo con los estudios clásicos de cruces varietales en maíz (Moll *et al.*, 1962; Moll *et al.*, 1965) y ofrece mejores expectativas del

comportamiento de las poblaciones *per se* al incorporar alelos distintos para diversos caracteres de interés (Goodman *et al.*, 2000; Lellis *et al.*, 2001), así como de las líneas e híbridos formados a partir de ella (Cortez *et al.*, 1985).

El siguiente nivel de variabilidad en orden descendente era de esperarse en las cruza inter-raciales (P-GXJ, P-GXS y P-JXS) y la mas baja variabilidad dentro de los grupos raciales (P-GXG, P-JXJ, y P-SXS); sin embargo, el espectro de variabilidad observada en las poblaciones entre pares de tipos raciales (0.28 y 0.40) incluyó la variabilidad (0.32 a 0.36) de las poblaciones dentro de los grupos raciales (Cuadro 5). Considerando el promedio de ambos grupos de cruza, se encontró que su diversidad es igual (0.34). La dispersión mostrada por el espectro de la diversidad en las poblaciones intra-raciales, puede ser explicada considerando que el tipo guajillo virtualmente no ha sido sometido a mejoramiento genético, ya que los materiales cultivados son variedades nativas y las variedades liberadas por diversas instituciones son simples accesiones con cierto grado de pureza y uniformidad genética (Ramiro, 1992; Ramiro, 2001). Por el contrario, los tipos jalapeño y serrano son los que más mejoramiento genético han recibido y probablemente han sufrido, por ello, algún grado de erosión genética, como lo asegura (Hernández *et al.*, 2004).

Independientemente de los sesgos que pudieran tener los resultados de esta investigación, derivados de la muestra germoplásmica en cada tipo racial y del nivel de mejoramiento a que estos materiales han sido sometidos, los resultados de esta investigación, aún cuando no se ajustan estrictamente a las hipótesis planteadas, dan evidencias empíricas de que la formación de poblaciones mediante la recombinación de dos o mas tipos raciales es una estrategia importante para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente en Chile y coincide con resultados previamente obtenidos (Robledo, 2005; Robledo *et al.*, 2005).

**Cuadro 5.** Índice de diversidad genética de poblaciones de Chile con base en la fórmula de (Powell *et al.*, 1996).

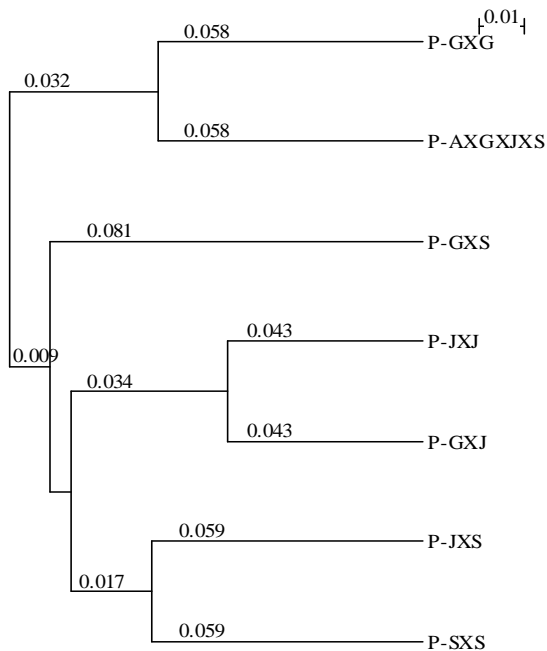
Poblaciones	Combinaciones				*I.D.
	ACA/CTG	AAG/CAG	AAG/CAC	AAG/CAAA	media
P-SXS	0.62	0.35	0.02	0.33	0.33
P-AXGXJXS	0.67	0.46	0.24	0.54	0.48
P-GXG	0.44	0.43	0.30	0.43	0.40
P-JXS	0.52	0.37	0.15	0.29	0.33
P-GXJ	0.37	0.40	0.16	0.36	0.32
P-JXJ	0.32	0.24	0.15	0.42	0.28
P-GXS	0.63	0.43	0.15	0.22	0.36

\* I.D. = Índice de diversidad.

Finalmente las relaciones genéticas entre poblaciones fueron calculadas utilizando la matriz de distancias genéticas (Nei y Li, 1979). Con estos datos se realizó un dendrograma por el método UPGMA (Figura 2). Se encontró que se



formaron dos grupos: en el primero se encontraron las poblaciones P-AXGXJXS y P-GXG en este fue donde se encontró las poblaciones mas heterogéneas en términos de su índice de diversidad, el segundo grupo a su vez se dividió en tres subgrupos: en el primero se encontró la población P-GXS; en el segundo P-JXJ y P-GXJ y en el tercero P-JXS y P-SXS. En el segundo grupo las poblaciones fueron más homogéneas (Figura 1).



**Figura 2.** Dendrograma de disimilitudes genéticas entre poblaciones de Chile con base en el método UPGMA y datos AFLP.

## CONCLUSIONES

Se formaron satisfactoriamente siete poblaciones. Tres intra-raciales P-SXS, P-JXJ, P-GXG y cuatro inter-raciales P-JXS, P-GXJ, P-GXS, P-AXGXJXS.

La variabilidad en las siete poblaciones, indicada por el índice de diversidad, varió de 0.28 a 0.48 y la mayor variabilidad se encontró en la población P-AXGXJXS seguida de P-GXG con un índice de diversidad de 0.48 y 0.40 respectivamente.

La formación de poblaciones mediante la recombinación de dos o más tipos raciales incrementa la variabilidad genética y las hace apropiadas para realizar mejoramiento poblacional por selección recurrente, dependiendo de los tipos raciales involucrados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cortez M. H., A. Rodríguez, M. Gutiérrez, J. Durón, R. Girón, y M. Oyervides. 1985. Evaluation of broad-base improved populations of maize (*Zea mays* L.). I. Cumulative gene effects and heterosis. Publication especial. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 43 p.
- Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Gebhardt C., E. Ritte, T. Debener. 1989. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. Theor. Appl. Genet. 78: 65-75.
- Goodman M. M., J. Moreno, F. Castillo, R. N. Holley, and M. L. Carson. 2000. Using tropical maize germplasm for temperate breeding. Maydica 45: 221-234.
- Guzmán F. A., H. Ayala, C. Azurdia, M. C. Duque, y M. C. de Vicente. 2005. AFLP Assessment of Genetic Diversity of *Capsicum* Genetic Resources in Guatemala: Home Gardens as an Option for Conservation. Crop Sci. 45:363-370.
- Hernández V. S., R. G. Guevara, R. F. Rivera, C. Vázquez, y K. Oyama. 1998. Los parientes silvestres del chile (*Capsicum spp.*) como recursos genéticos. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 62: 171-181.
- Hallauer A. R., W. A. Russell, and K. R. Lamkey. 1988. Corn Breeding In: Corn and Corn Improvement. p. 463-564. 3a. Ed. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Hernández V. S., R. Luna, C. Sánchez, A. G. Rodríguez, R. F. Rivera, R. G. Guevara, P. Sánchez, A. Casas, y K. Oyama. 2004. Variación genética y en la resistencia a virus en poblaciones silvestres de chile (*Capsicum annuum*) silvestre de México. In: I. Torrez P., M. M. González, S. Montes, R. Bejarano, y R. G. Guevara. (Eds). Memoria de la Primera convención mundial de chile. p. 447-453.
- Lellis M. C., J. Branco, y E. P. Gorgulho. 2001. Partial diallel cross between exotic and adapted maize populations evaluated in acid soil. Scientia Agricola 58: 313-319.
- Loaiza F. F., K. Ritland, J. A. Laborde, and S. D. Tanksley. 1989. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. Plant Syst. Evol. 165: 159-188.
- Márquez S. F. 1991. Genotecnia Vegetal. Métodos, Teoría, Resultados. AGT Editor, México, D. F., México. Tomo II. 458 p.

- Miller J. C., and S. D. Tanksley. 1990a. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
- Moll R. H., S. Salhauana, and H. F. Robinson. 1962. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize. *Crop Sci.* 2: 197-198.
- Moll R. H., J. H. Lonquist, V. Fortuno, and E. C. Johnson. 1965. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics* 52: 139-144.
- Nei M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Orona C., V. Pecina, M. A. Rocha, V. M. Parga, O. Martínez, I. H. Almeida. 2004. Caracterización de variedades y líneas élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR. *Revista internacional de botánica experimental ΦYTON.* p. 289-300.
- Paran I., E. Aftergood, and C. Shifriss. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-174.
- Powell W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanaffey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparasion of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Prince J. P., E. Pochard, and S. D. Tanksley. 1992. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome* 36: 404-417.
- Ramiro C. A. 1992. VR-91 nueva variedad de chile mirasol o guajillo. Folleto Técnico #2. Campo Experimental Palma de la Cruz, San Luis Potosí, México.
- Ramiro C. A. 2001. Guajillo San Luis y Guajillo INIFAP nuevas variedades de chile mirasol para Centro-Norte de México. Folleto Técnico #14. Campo Experimental Palma de la Cruz, San Luis Potosí, México.
- Robledo G. E. 2005. Potencial genético de cruzas inter-raciales en el mejoramiento de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. 66p.
- Robledo G. E., G. Martínez, M. Ramírez, A. de la Rosa, J. A. R. Dorantes. 2005. Cruzas inter-raciales en chile: ¿promiscuidad genética o estrategia de mejoramiento?. Memoria, XIX Congreso Nacional de Citogenética SOMEFI, A. C., El cerrillo, Toluca, México. 19-24 sept. P262.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

Zewdie Y. and A. C. Zeven. 1997. Variation in Yugoslavia hot pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions. *Euphytica* 97: 81-89.

