

13<sup>a</sup> CONVENCIÓN MUNDIAL DEL CHILE  
Campeche  
CAMPECHE, MÉXICO.



MEMORIAS  
PROCEEDINGS

**MEMORIAS 13ª Convención Mundial del Chile**

Octubre, 2016

Comité Nacional Sistema Producto Chile, A.C.  
Consejo Nacional de Productores de Chiles, S.C.  
Calle Reforma #128, Col. Burócrata  
C.P. 34279, Durango, Dgo; México.  
convencion@conaproch.com  
www.convencionmundialdelchile.com  
Tel. +52 (618) 810 31 54

Cuidado de la edición:  
L.E.P. Alma Noemí Córdova Reséndiz  
Lic. Isaías Jesús Guadiana Luna

Diseño de Portada e interiores:  
L.D.G. Genaro Ruiz Flores González

Diseño y Maquetación:  
Ediciones Gráficas Deseret

Traducción:  
Autores y coautores de los trabajos de Investigación  
Ing. Agrónomo Fitotecnista Rubén Armando Gómez Gallardo Unzueta

Impreso y hecho en México  
*Made and printed in Mexico*

Queda prohibida la reproducción parcial o total, directa o indirectamente del contenido de la presente obra, sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito de los respectivos autores, en términos de la ley Federal del Derecho de Autor y, en su caso, de los tratados internacionales aplicables; la persona que infrinja esta disposición se hará acreedora a las sanciones legales correspondientes.

# **DISEÑO Y FORMATO**

## **DESIGN AND FORMAT**

Lic. Diseño Gráfico Genaro Ruiz Flores González  
Ediciones Gráficas Deseret

## **INFORMACIÓN**

### **CONTACT**

Calle Reforma #128, Col. Burócrata  
C.P. 34279, Durango, Dgo; México.  
Tel. +52 (618) 810 31 54  
convencion@conaproch.com  
[www.convencionmundialdelchile.com](http://www.convencionmundialdelchile.com)

El contenido de las publicaciones de la presente memoria  
es responsabilidad de los autores.

Los resúmenes en inglés se publicaron tal cual fueron enviados por el autor.  
Se hicieron algunas correcciones de orden y sintaxis en el texto original.

The content of these proceedings is responsibility of the authors.  
Abstracts written in English are published just as they were sent by the author.  
Some corrections were made for grammar and form.



# IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VARIETADES DE *Capsicum annuum* L. MEDIANTE MARCADORES RAPD

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF VARIETIES OF *Capsicum annuum* L. BY RAPD

*Valeria Bobadilla Larios*<sup>1</sup>, *Edgar Esparza Ibarra*<sup>1</sup>, *Jorge Luis Ayala Luján*<sup>2</sup>,  
*Perla Ivonne Gallegos Flores*<sup>1</sup> y *Lucía Delgadillo Ruiz*<sup>1</sup>

### RESUMEN

En México existe una gran diversidad de especies y variedades de chile con gran importancia cultural, gastronómica y económica. La especie domesticada *Capsicum annuum* agrupa la mayoría de los tipos cultivados y es de gran importancia en México y el mundo; gran parte de esta importancia radica en la riqueza genética que posee; por ende, existe la necesidad de su estudio mediante técnicas moleculares de análisis genético, entre ellas los marcadores moleculares RAPD (Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar), los cuales arrojan información genética de manera rápida y relativamente económica. Se utilizaron seis variedades de *C. annuum*, facilitadas por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), en el Campo Experimental Zacatecas (CEZAC), siendo de tipo “ancho” y “mirasol”, clasificadas en variedades de polinización libre y variedades criollas, de acuerdo a su nivel tecnológico. Se realizó un análisis RAPD con el objetivo de evaluar la variabilidad genética e identificar molecularmente las variedades de *C. annuum* a partir de un dendrograma. Los resultados obtenidos mostraron poca variabilidad entre las seis variedades de *C. annuum*, el dendrograma resultante mostró dos agrupaciones principales, identificándose de acuerdo a su nivel tecnológico, demostrando que los RAPD son una herramienta útil en la detección de variación y poseen gran poder para la estimación de las similitudes genéticas en *C. annuum*.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, RAPD, variabilidad genética.

- 1 Laboratorio de Biotecnología, Unidad Académica de Ciencias de Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus II, Zacatecas. Av. Preparatoria, Hidráulica, Zacatecas, Zac. [valeriabobadilla-larios@gmail.com](mailto:valeriabobadilla-larios@gmail.com); [edgarzac@gmail.com](mailto:edgarzac@gmail.com); [perla\\_gf17@hotmail.com](mailto:perla_gf17@hotmail.com); [delgadillolucia@gmail.com](mailto:delgadillolucia@gmail.com)
- 2 Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Carretera Zacatecas-Guadalajara Km. 6, Ejido La Escondida, Zacatecas. [jorgeayala69@hotmail.com](mailto:jorgeayala69@hotmail.com)



## ABSTRACT

In Mexico there is a great diversity of species and varieties of chili with great cultural, culinary and economic importance. The domesticated species of *Capsicum annuum* gathered most of cultivated types of chili and is very important in Mexico and around the world; the importance relapse in the it's genetic richness, for this reason, is necessary a study using molecular genetic analysis techniques, including molecular markers RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA), which provides a genetic information quickly and a relatively low cost. Six varieties of *C. annuum*, facilitated by INIFAP (National Forestry, Agriculture and Poultry Research Institute) from Zacatecas Experimental Station (CEZAC) were used, considering "Ancho" and "Mirasol" types as classified pollinated varieties and as landraces respectively, according to their technological level. An RAPD analysis was used in order to evaluate the genetic variability and to identify the molecular variabilities of *C. annuum* from a dendrogram. The results showed a little variability among the six varieties of *C. annuum*, the resulting dendrogram showed two main groupings, identified according to their technological level. RAPD demonstrated to be a useful tool to detect variations and have great power for estimate genetic similarities in *C. annuum*.

**Keywords:** *Capsicum annuum*, RAPD, genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

La especie *C. annuum*, tiene una gran importancia cultural, económica y alimentaria en México y el estado de Zacatecas, presentando la mayor variabilidad morfológica y genética (Hernández *et al.*, 2001). En nuestro país, se hace necesario aumentar el estudio de este recurso mediante análisis genéticos, con los objetivos principales de caracterización, conservación, evaluación y mejoramiento.

La identificación molecular es, en esencia, la aplicación o utilización de variabilidad genética para distinguir entre individuos y separarlos en taxones o viceversa, para vincularlos y agruparlos con el fin principal de delimitar con mayor precisión un recurso vegetal, también posee el potencial para distinguir de forma rápida organismos de interés en estadios tempranos del desarrollo y, por ende, es de utilidad para el mejoramiento vegetal. El manejo humano es de interés en la identificación, ya que los métodos de selección y reproducción a los que son sometidas las variedades según su categoría tecnológica, tienen un impacto genético. La especie *C. annuum*, puede clasificarse en tres categorías según su nivel tecnológico (1) variedades híbridas, (2) variedades de polinización libre, y (3) variedades criollas. Los híbridos mejorados representan, en teoría, el nivel tecnológico más alto, y los criollos el más bajo (Luna, 2010; Reveles *et al.*, 2013).

Los marcadores moleculares, entre los que se incluyen los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), constituyen una técnica para la identificación de variaciones en la secuencia de ADN entre individuos Rentarúa (2007), por lo cual son una herramienta útil para el estudio genético de especies de *Capsicum annuum*. El objetivo fue analizar variedades de *Capsicum annuum* mediante marcadores RAPD, para evaluar la variabilidad genética e identificar molecularmente mediante las agrupaciones obtenidas en el dendrograma.



## MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal que se utilizó fueron plántulas de *C. annuum* facilitadas por el INIFAP Campo Experimental Zacatecas (CEZAC). Las variedades utilizadas son dos tipos; ancho y mirasol.

Tipo ancho con las variedades:

1. Testigo calera (criollo)
2. Tres venas villista 1 (criollo)
3. Dos venas villista 2 (criollo)

Tipo mirasol con las variedades:

4. 2 venas INIFAP (criollo)
5. Don Luis, S.L.P. (polinización libre)
6. Don Ramón, S.L.P. (polinización libre)

### Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy® Plant Mini de QIAGEN™, siguiendo las recomendaciones del fabricante, a partir de hojas sanas y frescas de plantas de chile con 18 semanas de desarrollo fueron mantenidas bajo las condiciones de invernadero del CEZAC. La cuantificación del ácido nucleico obtenido de cada muestra se llevó a cabo en un espectrofotómetro (Quawell UV spectrophotometer Q5000); su pureza fue determinada considerando relaciones de absorbancia de 260/280 y 260/230 nm.

### Condiciones de la PCR con cebadores arbitrarios

Las reacciones de amplificación se desarrollaron con los siguientes cebadores: OPA 02, OPA 11 y OPA 20, sintetizados por Invitrogen™. La mezcla de reacción fue de 25µl con 50-78 ng de ADN genómico, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM dNTP (Fermentas), 0.4 µM de cada cebador, 1 Unidad de Taq ADN polimerasa (ACTGene), 1X Buffer de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Promega). Los ciclos de amplificación fueron; 2 minutos a 95 °C, 44 ciclos; 30 segundos a 95 °C por, 1 minuto a 36 °C, 45 segundos a 72 °C, y un ciclo final de 5 minutos a 72 °C en un Termociclador Thermal Cycler (Labnet Multi Gene II).

Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1X con bromuro de etidio, para éstos fue usado el Wide Range DNA Marker (SIGMA) como marcador de referencia. La electroforesis se llevó a cabo por 60 min a 90V.

### Análisis de similitud y dendrograma

Con los resultados de la amplificación se elaboró una matriz de resultados 0/1 donde se evaluó las bandas como ausentes (0) o presentes (1) para cada uno de los materiales estudiados. Las estimaciones de similitud genética mediante la matriz obtenida se calcularon de acuerdo al índice de similitud de Jaccard (1908). Se construyó un dendrograma usando la técnica *Clúster análisis* empleando el método de agrupamiento UPGMA (Media Aritmética No Ponderada) (Sneath & Sokal, 1973). Además se realizó una prueba estadística Bootstrap con 5000 remuestreos. Todos los análisis estadísticos, visualización y edición de dendrograma (árbol o fenograma) se llevaron a cabo mediante tres softwares Free Tree, Tree View y FigTree (Hampel *et al.*, 2001).

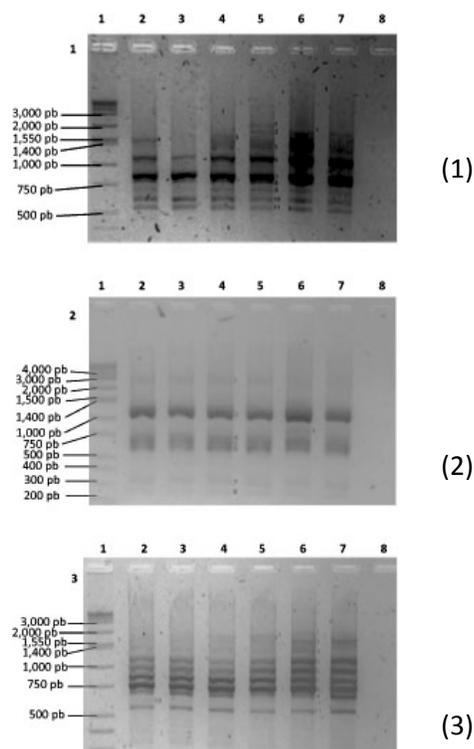


## Análisis de los polimorfismos obtenidos por cada cebador

A partir de la matriz de 0/1 creada por los patrones de bandas, se identificaron las bandas comunes o monomórficas (que aparecen en todas las variedades) y bandas polimórficas (que aparecen sólo en algunas variedades) amplificadas por un cebador. Con base en esto se calculó el porcentaje de polimorfismo que se obtuvo con cada cebador.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres cebadores empleados amplificaron satisfactoriamente y produjeron un total de 30 bandas, con un promedio de 10 bandas por cebador. El cebador OPA 20 amplificó un total de 11, OPA 02 amplificó 11 y OPA 11 sólo 8 (figura 1). De las 30 bandas amplificadas, sólo 9 fueron polimórficas, siendo el OPA 02 el cebador que aportó mayor porcentaje de polimorfismo con 45.45% debido a la amplificación de 5 de estas bandas. La alta eficiencia de un cebador está dada por el total de bandas amplificadas (monomórficas) esto es indicativo de la zona del genoma que complementa y permite el apareamiento de bases entre el cebador y el ADN genómico (Karp y Edwards, 1997). Pero son las bandas polimórficas las esenciales para identificar, por lo que a pesar de poseer la misma eficiencia de amplificación OPA 20 y OPA 02, este último posee el poder discriminatorio más alto (Tabla 1).



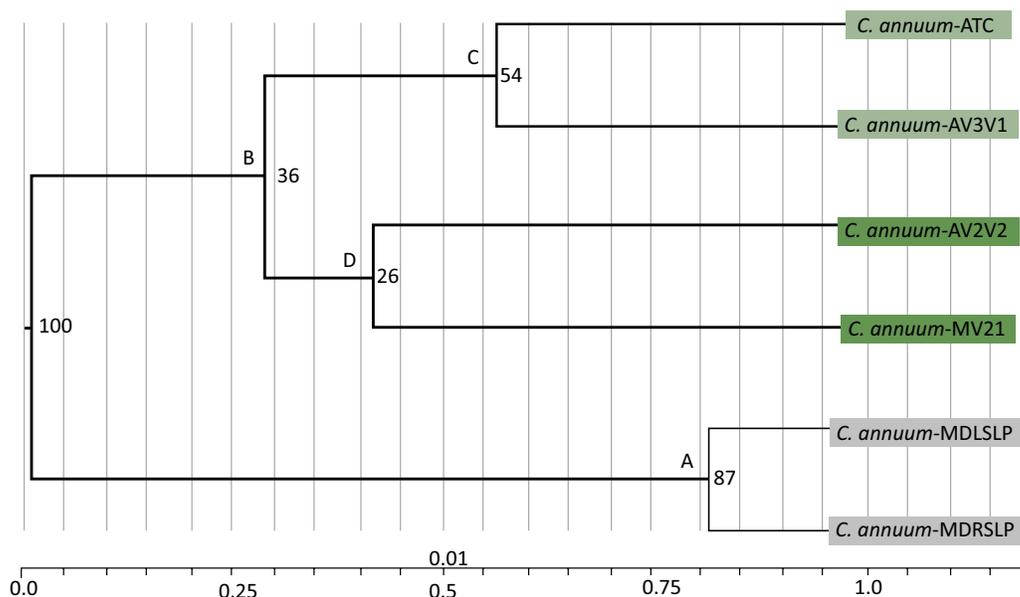
**Figura 1.** RAPD con los iniciadores OPA 02 (1), OPA 11 (2) y OPA 20 (3). Electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt. 1, marcador de tamaño molecular (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker). 2-ancho testigo Calera. 3-ancho tres venas villista 1. 4-ancho dos venas villista 1. 5-mirasol 2 venas INIFAP. 6-mirasol Don Luis, SLP. 7-mirasol Don Ramón, SLP. 8-control negativo (amplificación con agua sin ADN). Los números dentro de cada gel indican las bandas analizadas.



**Tabla 1.** Total de bandas amplificadas por los 3 cebadores en las 6 variedades de *C. annuum*, por ciento de polimorfismo y eficiencia del cebador.

Cebador	Secuencia de los cebadores (5´- 3´)	Total de bandas amplificadas	Total de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo (%)	Eficiencia del cebador (%)
OPA 02	TGCCGAGCTG	11	5	45.45	36.66
OPA 11	CAATCGCCGT	8	1	12.5	26.66
OPA 20	GTTGCGATCC	11	3	27.27	36.66
Total		30	9	30	-

El coeficiente de similitud generado con base en la matriz, varió desde 0.74074 hasta 0.96154 con un valor medio de 0.85114. El grado de similitud entre (ancho tres venas villista y mirasol Don Luis, S.L.P.) y (ancho testigo Calera y mirasol Don Luis, S.L.P.) mostró la variación genética más alta con el valor para los coeficientes de similitud de 0.74074 y 0.75000, respectivamente. Considerando que se encontró que el valor de similitud más alto de 0.96154 entre mirasol Don Luis, S.L.P. y mirasol Don Ramón, S.L.P. Los resultados de similitud que se obtuvieron indican poca variabilidad, una posible respuesta está dada por la estrecha relación filogenética de los materiales empleados, así como la elección de los cebadores y la naturaleza de este tipo de marcadores los cuales al ser arbitrarios, pudieron hibridar en regiones del ADN que no estaban relacionadas con el carácter diferenciador. A pesar de esto, los valores que se obtuvieron tienen una correspondencia con el nivel tecnológico de estas variedades, demostrando la capacidad de la técnica para diferenciar y agrupar variedades según su nivel tecnológico a pesar de la alta similitud genética presentada por los materiales. Mediante la similitud de Jaccard (1908), se generó un dendrograma, que dividió las 6 variedades de *C. annuum* en 2 grupos principales con los códigos (A) y (B). El grupo (B) se conforma de las variedades criollas de calidad, presentando un 36% de robustez en el agrupamiento, el cual se divide en 2 subgrupos con los códigos (C) y (D) mostrando un 54% y 26% de robustez, respectivamente; el primero conformado con las variedades ancho testigo Calera y ancho tres venas villista, y el segundo con mirasol 2 venas INIFAP y ancho dos venas villista 2. El grupo (A) posee la rama más fuerte, con 87%, se conforma con las variedades de polinización libre, las cuales son mirasol Don Luis, SLP y mirasol Don Ramón, S.L.P. (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma resultante de las distancias genéticas entre los genotipos de *C. annuum* estudiados, obtenidas por el análisis RAPDs utilizando el índice de similitud de Jaccard (1908), y el método de agrupamiento UPGMA. El número en los nodos corresponde al valor de robustez de los datos (Bootstrap) que soporta a la rama del árbol después de 5000 réplicas.

A pesar que no se obtuvo una alta variación genética entre variedades, en el dendrograma obtenido se observa que los cebadores OPA utilizados en este estudio lograron agrupar coherentemente las variedades diferenciando variedades de polinización libre (PL) grupo (A), y las variedades criollas de calidad grupo (B), denotando variabilidad entre materiales debido a su nivel tecnológico, que implica la capacidad de identificar con base en RAPD los materiales con mayor uniformidad genética debida a su proceso de selección y mejoramiento; el subgrupo (D) de variedades criollas con la característica “dos venas” se agrupó a pesar de pertenecer a diferentes tipos, uno perteneciente al tipo mirasol y el otro a tipo ancho, esta agrupación resulta interesante, ya que comparten el mismo carácter morfológico (dos venas), tomando en cuenta que éste se utiliza como una característica para lograr uniformidad al llevar a cabo la selección de criollos de calidad, el proceder de un origen de selección parecido puede ser motivo de la similitud presente entre este grupo, aunque el hecho de que la variedad mirasol no se agrupara con las variedades de su mismo tipo se puede deber a que éstas son de polinización libre y provienen de la autofecundación controlada de un solo progenitor con alta pureza genética, con subsiguientes selecciones, que derivan de una alta homología entre las mismas. Por último, el subgrupo (C), con ancho testigo Calera y ancho tres venas villista, la primera no pasó por el proceso de selección de lóculos o venas, ésta fue la agrupación con el segundo nivel de más alta similitud con un coeficiente de 0.91304. Todas estas agrupaciones denotan alta similitud genética en la secuencia de estas variedades, reflejada en la poca variabilidad obtenida, pero se logran diferenciar, corroborando que estos marcadores moleculares poseen potencial en el análisis molecular de *C. annuum*.



## CONCLUSIONES

El análisis RAPD mostró variación genética entre las variedades utilizadas de *C. annuum*, las agrupaciones generadas en el dendrograma identifican los materiales de acuerdo a su nivel tecnológico (criollo o polinización libre), todos los cebadores empleados generaron bandas, siendo el OPA 02 el más polimórfico y el OPA 20 el que más fragmentos generó.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hapl, V., Pavlíček, K. y Flegr J. 2001. Construction and bootstrap analysis of ADN fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 731-73.
- Hernández-Verdugo, S. Luna-Reyes, R. & Oyama, K. 2001. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* from Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 226: 129-142.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44: 223-270.
- Karp, A. & Edwards, K. J. 1997. DNA markers a global overview. In: G. Caetano-Anolle's and P.M. Gresshoff, (Eds) *DNA Markers Protocols, Application and Overviews*. Wiley, New York. pp. 1-13.
- Luna, R. J. 2010. Variedades de Chile y producción de semilla. Primer Foro para Productores de Chile (pp. 23-43). Zacatecas, México. Consejo Estatal de Productores de Chile.
- Rentaría, A. M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X. (comps.). *Ecología Molecular*. (pp. 541-556).
- Reveles, H. M., Velásquez, V. R., Reveles, T. L. & Mena, C. J. 2013. *Selección y conservación de semilla de Chile: primer paso para una buena cosecha*. (Disponible por en INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro Campo Experimental Zacatecas, Calera de V. R., Zac. Folleto Técnico núm. 51, ISBN: 978-607-37-0139-6).
- Sneath, H. A. & Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. San Francisco, California, E.U.A.: W. H. Freeman and Company.