



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS, HÍBRIDOS Y
COLECTAS DE CHILE MANZANO**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DIRECCION DE SERVICIOS ESCOLARES
COMISION DE EXAMENES PROFESIONALES**

PLACIDO FACUNDO ANGEL

Bajo la supervisión de: DR. MARIO PÉREZ GRAJALES



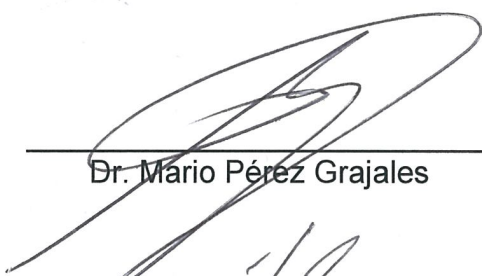
Chapingo, Estado de México, junio de 2019

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS, HÍBRIDOS Y COLECTAS DE CHILE MANZANO

Tesis realizada por **PLACIDO FACUNDO ANGEL**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Director:



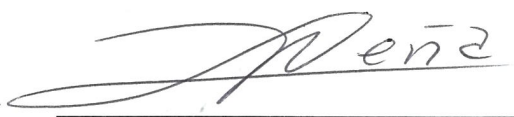
Dr. Mario Pérez Grajales

Asesor:



Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

Asesor



Dr. Aureliano Peña Lomelí

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	viii
RESUMEN GENERAL.....	ix
GENERAL SUMMARY	x
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1.1 Objetivos.....	13
1.2 Hipótesis	13
2 REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1 Importancia del chile manzano	14
2.2 Mejoramiento genético	15
2.3 Marcadores moleculares	16
2.3.1 ISSR	17
2.3.2 RFLPs.....	18
2.3.3 RAPDs.....	18
2.3.4 AFLPs.....	19
2.3.5 Microsatélites	20
2.3.6 SNPs	20
2.4 Agrupamiento de genotipos	21
2.5 Literatura citada	22
3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS, HÍBRIDOS Y COLECTAS DE CHILE MANZANO.....	26
3.1 RESUMEN	26
3.2 ABSTRACT.....	27
3.3 INTRODUCCIÓN	28
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.4.1 Sitio experimental.....	30
3.4.2 Genotipos empleados.....	30
3.4.3 Extracción de ADN	32
3.4.4 Cuantificación de la pureza y calidad del ADN.....	33
3.4.5 PCR condiciones de amplificación y separación de fragmentos.....	34

3.4.6	Análisis de geles.....	35
3.4.7	Análisis estadístico.....	36
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.5.1	Análisis de los patrones de marcadores ISSR.....	37
3.5.2	Análisis del agrupamiento de líneas	39
3.5.3	Análisis del grupamiento de híbridos	40
3.5.4	Análisis del grupamiento de colectas	43
3.5.5	Análisis conjunto de líneas, híbridos y colectas.....	45
3.6	Discusión general	48
3.7	CONCLUSIONES	51
3.8	LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Líneas, híbridos y colectas de chile manzano empleados en la caracterización molecular con marcadores ISSR.	31
CUADRO 2. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de líneas, híbridos y colectas de chile manzano.	35
CUADRO 3. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización de la divergencia genética de 58 genotipos de chile manzano, temperatura de alineamiento empleada (Ta), número total de bandas amplificadas (NTBA), número de bandas polimórficas (NBP), porcentaje de polimorfismo (PP) y porcentaje de monomorfismo (PM).	38
CUADRO 4. Agrupamiento de nueve líneas de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.....	40
CUADRO 5. Agrupamiento de 17 híbridos de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.....	43
CUADRO 6. Agrupamiento de 32 colectas de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.....	44
CUADRO 7. Agrupamiento de 9 líneas, 17 híbridos y 32 colectas de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.....	47
CUADRO 8. Cruzas sugeridas entre líneas de chile manzano con base en disimilitud genética superior a 0.80.	49
CUADRO 9. Colectas con potencial para generar líneas o cruzas intervarietales de chile manzano con base en su disimilitud genética	50
CUADRO 10. Relación genética entre líneas y colectas de chile manzano.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para nueve líneas avanzadas de chile manzano.	39
FIGURA 2. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para 17 híbridos de chile manzano.	41
FIGURA 3. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para 32 colectas de chile manzano.	44
FIGURA 4. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para 58 genotipos de chile manzano.	46
FIGURA 5. Criterio para la determinación del número de agrupamientos de 58 genotipos de chile manzano con el método de la varianza mínima de Ward.	46

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **Instituto de Horticultura**, por mi formación como Maestro en Ciencias en Horticultura.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT), por brindarme el financiamiento para la realización de mis estudios de maestría.

A mi Comité Asesor integrado por el **Dr. Mario Pérez Grajales**, **Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez** y el **Dr. Aureliano Peña Lomelí**, quienes me apoyaron en todas las etapas de la investigación, compartieron sus conocimientos, me orientaron para tomar las mejores decisiones y sobre todo me brindaron su amistad y confianza.

A los técnicos del laboratorio de Marcadores Moleculares M.C. María Elisa Alvarado Cano y, especialmente, Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por su paciencia y enseñanzas durante el desarrollo de la etapa experimental del presente trabajo.

A Jorge Luís Sanchez Galicia por su apoyo en la realización de los trabajos de la etapa experimental.

A los compañeros del posgrado, particularmente a Ismael y Rebeca, por el trabajo en equipo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Placido Facundo Angel

Fecha de nacimiento: 05 de octubre de 1987

Lugar de nacimiento: Pajapan, Veracruz

CURP: FAAP871005HVZCNL09

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia

Cédula Profesional: 10114464



Desarrollo académico

Bachillerato 2005 – 2009 Universidad Autónoma Chapingo

Licenciatura 2009 – 2013 Universidad Autónoma Chapingo

Maestría 2017 – 2018 Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

Caracterización molecular de líneas, híbridos y colectas de chile manzano¹

El análisis de la variabilidad genética del germoplasma de un programa de mejoramiento genético permite definir las estrategias necesarias para conservar, utilizar y enriquecer esta variación. La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar líneas, híbridos y colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) mediante marcadores moleculares ISSR's, con el fin de determinar el grado de variabilidad genética de este germoplasma e identificar grupos genéticamente distantes para definir estrategias en la generación de híbridos, tanto intervarietales, como de cruza simple. Los marcadores moleculares ISSR caracterizaron adecuadamente líneas, híbridos y colectas de chile manzano a partir de 20 iniciadores; se generaron 296 productos amplificados, de los cuales 210 permitieron diferenciar genotipos (70.9 % de polimorfismo). Análisis multivariados generaron cinco grupos para líneas avanzadas, siete para híbridos de cruza simple derivados de las líneas, seis para colectas y siete en el análisis general, con distancia genética promedio de 0.77, 0.71, 0.65 y 0.74 respectivamente. Se detectó variabilidad genética entre las líneas estudiadas, por lo que se considera que la cruza entre líneas de grupos distantes genéticamente, podrían generar híbridos de cruza simple sobresalientes. Lo anterior debido a que los híbridos sobresalientes se ubicaron en grupos distintos a los de sus respectivos progenitores; mismos que también difirieron en su ubicación dentro de grupos. La mayoría de las colectas (26) se diferenciaron de líneas e híbridos, y dentro de ellas fue posible subdividirlas en seis subconjuntos. Esto sugiere la posibilidad de cruzamientos intervarietales de grupos distintos; o bien que a partir de estas poblaciones se generen nuevas líneas para la conformación de híbridos de cruza simple.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, caracterización, marcadores moleculares, ISSR.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Plácido Facundo Angel
Director de tesis: Dr. Mario Pérez Grajales

GENERAL SUMMARY

Molecular characterization of lines, hybrids and collections of manzano hot pepper²

The analysis of the genetic variability of the germplasm of a genetic improvement program allows to define the necessary strategies to conserve, use and enrich this variation. The objective of the present investigation was to characterize lines, hybrids and collections of Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.) by means of ISSR's molecular markers, in order to determine the degree of genetic variability of this germplasm and identify genetically distant groups for define strategies in the generation of hybrids, both intervarietal, and simple cross. The ISSR molecular markers adequately characterized lines, hybrids and Manzano hot pepper collections from 20 primers; 296 amplified products were generated, of which 210 allowed to differentiate genotypes (70.9% of polymorphism). Multivariate analyses generated five groups for advanced lines, seven for single-cross hybrids derived from the lines, six for collections and seven in the general analysis, with average genetic distance of 0.77, 0.71, 0.65 and 0.74 respectively. Genetic variability was detected among the lines studied, so it is considered that the crossing between lines of genetically distant groups could generate hybrids of outstanding single crosses. This was due to the fact that the outstanding hybrids were located in groups different from those of their respective parents; They also differed in their location within groups. Most of the collections (26) were differentiated from lines and hybrids, and within them it was possible to subdivide them into six subsets. This suggests the possibility of intervarietal crosses of different groups; or that from these populations new lines are generated for the conformation of single-cross hybrids.

Key words: *Capsicum pubescens*, characterization, molecular markers, ISSR.

²Thesis of master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Placido Facundo Angel
Advisor: Dr. Mario Pérez Grajales

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de *Capsicum* (Solanaceae) se originó en América Central y América del Sur, con las especies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense* (Shirasawa, 2013).

El chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es una planta perenne y de media sombra, originaria de las partes altas de Bolivia, Perú y Chile, se puede encontrar desde Argentina hasta el centro de México. En este México fue introducido a mediados del siglo XX, y se encuentra en altitudes de 1700 a 2500 m, principalmente en los estados de Puebla, Michoacán, Veracruz, Estado de México y Chiapas, donde se le aprecia por su sabor y picor. En esos Estados puede encontrarse variabilidad en cuanto a tipo de crecimiento de la planta, color, tamaño y forma de fruto (Pérez y Castro, 2012).

Actualmente, en México, se cultivan 1,500 hectáreas de chile Manzano con incremento en la demanda de esta especie tanto en México como en Estados Unidos de América. Por esa razón se han desarrollado sistemas de producción para condiciones de invernadero y paralelamente estudiado la genética y fisiología de este cultivo, particularmente, a través del Programa de Producción y Mejoramiento Genético de Chile Manzano de la Universidad Autónoma Chapingo, desde 1994. El propósito del programa ha sido generar líneas e híbridos sobresalientes en rendimiento y calidad de fruto para satisfacer la demanda de un mercado creciente y exigente en cuanto a las cualidades organolépticas del fruto.

El proceso de selección de líneas puras como progenitores de híbridos de alto rendimiento y calidad de fruto que se realizan en los programas de mejoramiento genético de plantas usualmente requiere: a) identificación de grupos heteróticos, b) realización de cruzamientos entre líneas de diferentes grupos heteróticos y c) evaluación de rendimiento y características agronómicas de los híbridos

generados (Melchinger y Gumber, 1998). Lo anterior implica la necesidad de conocer la variación fenotípica y genotípica existente en una colección de germoplasma.

El programa de mejoramiento genético de chile manzano cuenta con líneas avanzadas (F₇) e híbridos de cruce simple que se ha generado a través cruzamientos dialélicos (Griffing, método II). Estos genotipos han sido caracterizados morfológicamente con base a la guía técnica para la descripción de variedades de chile manzano, considerando caracteres de tallo, hoja, flor y fruto. Lo anterior ha permitido conocer la variación fenotípica existente y la identificación de materiales sobresalientes. Sin embargo, también es necesario conocer la variabilidad genotípica de líneas e híbridos existentes en el programa así como la de nuevos genotipos provenientes de colectas, para contribuir en la eficiencia del proceso de mejoramiento genético de esta especie.

La variación genotípica de especies vegetales puede explorarse mediante marcadores moleculares de forma rápida, precisa y eficiente (Aguilera *et al.*, 2011). Se han estudiado especies del género *Capsicum* utilizando marcadores moleculares como RAPD y AFLP para analizar las relaciones genéticas entre y dentro de las especies (Paran *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999), también la variación genética interespecífica empleando RFLP (Prince *et al.*, 1995), SSR para desarrollar mapas genéticos (Mimura *et al.*, 2012), y entre ellos, ISSR para generar perfiles moleculares y evaluar la variabilidad genética (Thul *et al.*, 2012; Ibarra-Torres *et al.*, 2015). Particularmente, los marcadores ISSR no requieren conocimiento previo del genoma y generan alto polimorfismo con alta eficiencia para diferenciar el germoplasma de especies silvestres, además de los estudios de origen (Aguilera *et al.*, 2011).

Específicamente en *C. pubescens* se compararon huellas de ADN genómicas en hoja y fruto para estimar el grado de entrecruzamiento ocurrido en diferentes ambientes en plantas experimentales, y los marcadores ISSR permitieron estimar el porcentaje de polinización cruzada, comparando la información genómica de ambas estructuras (Valadez-Moctezuma, 2015). Por otro lado, en el estudio de

caracterización morfológica y molecular de *C. pubescens* se encontró variabilidad cualitativa y cuantitativa suficiente en 15 colectas evaluadas que podrían emplearse para los programas de mejoramiento genético de esta especie (Martínez, 2016).

1.1 Objetivos

General:

Caracterizar líneas, híbridos y colectas de chile manzano mediante marcadores moleculares ISSR's para identificar grupos de genotipos genéticamente distantes de este germoplasma y definir estrategias en la generación de híbridos, tanto intervarietales, como de cruce simple en el programa de mejoramiento genético de la UACH

Particulares:

Probar diferentes iniciadores ISSR mediante PCR para identificar los de mayor polimorfismo.

Identificar polimorfismos entre y dentro de líneas, híbridos y colectas de chile manzano.

1.2 Hipótesis

Los marcadores moleculares ISSR's permiten identificar grupos de genotipos genéticamente distantes entre y dentro de líneas, híbridos y colectas de chile manzano del programa de mejoramiento genético de la UACH.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del chile manzano

El chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es una especie originaria de la región andina, introducido a México en el siglo veinte . Existen al menos 1500 ha distribuidas en la Sierra Norte de Puebla; Tacámbaro y Zitácuaro, Michoacán; Huatusco y Zongolica, Veracruz; Coatepec Harinas y San Miguel Tlaixpan, Estado de México; y San Cristóbal de las Casas y Motozintla, Chiapas, entre otros lugares (Pérez y Castro, 2012).

Generalmente la producción se realiza en zonas altas y frías, en huertos de traspatio y en superficies de no más de cinco hectáreas dónde se asocia con árboles frutales, dado que es una planta que requiere baja intensidad de luz. El cultivo depende del temporal y los rendimientos son relativamente bajos, cinco a siete $t \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$. En un sistema de producción intensivo en invernadero se obtienen 75 $t \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ y mayor calidad de fruto, lo cual representa una ventaja en la comercialización del producto (Pérez y Castro, 2012).

Existe gran diversidad en el chile Manzano en cuanto a color, forma y tamaño del fruto; los consumidores prefieren los de color amarillo sobre anaranjados y rojos, mientras que la preferencia se inclina hacia frutos en forma de manzana o cuadrada, y no hacia los que tienen forma de pera. Los frutos son carnosos, altamente picosos y aromáticos, preferentemente se consume en fresco, sólo o en salsas, rellenos, o picados en ensaladas (Pérez y Castro, 2012).

El cultivo de chile Manzano en invernadero está creciendo de manera vertiginosa y se caracteriza por el uso de malla-sombra, sustratos inertes, solución nutritiva, riego por goteo, sistema de tutorio, poda de ramas y hojas, control de plagas y enfermedades; todo ello enfocado a mejorar las condiciones de cultivo para

obtener mayor calidad, rendimiento y oportunidad en su producción para satisfacer la demanda de un mercado creciente.

A la par del uso de mejores tecnologías de producción, ha ocurrido la adopción y utilización de semilla híbrida. En el caso del chile manzano México ha sido el país en dónde más se ha estudiado y generado variedades mejoradas así como la tecnología de producción a través del Programa de Producción y Mejoramiento Genético del Chile Manzano en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

2.2 Mejoramiento genético

A partir de 1994 se crea el Programa de Producción y Mejoramiento Genético de Chile Manzano en la UACH; en donde el primer paso fue realizar una colecta amplia de material genético existente en México y en Sudamérica. Se identificó la variedad de diferentes caracteres agronómicos y se inició un proceso de mejora genética para la obtención de variedades e híbridos. Paralelamente, se hizo la investigación para generar la tecnología de producción intensiva en condiciones de invernadero (Pérez y Castro, 2012).

En cuanto a variedades, se han generado híbridos interpoblacionales precoces, de rendimiento y calidad de fruto altos, entre otras características ventajosas. La generación de ellos fue a través de cruza de los mejores individuos de diferentes materiales seleccionados en varios ciclos o años. La evaluación de genotipos obtenidos fue con el uso del diseño dialélico de Griffing, Método II (Griffing, 1956).

En 2002 se generó el primer híbrido intervarietal de chile manzano (Puebla x Zongolica) en México, el cuál fue evaluado y descrito de acuerdo a los descriptores de *Capsicum* del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) con fines de registro de derechos de obtentor para la Universidad Autónoma Chapingo. En 2012 quedó registrado con el nombre de Grajales St. Paralelamente, se derivaron ocho líneas, a partir de individuos segregantes, de dicho material a través de cinco ciclos de autofecundación para

cada una de ellas. Estas líneas tienen características sobresalientes en calidad de fruto, pues tienen pericarpio grueso (al menos 0.5 cm), de tres a cuatro lóculos que les confiere la forma cuadrada, frutos grandes (al menos 70 mL), de color amarillo intenso, de picantes moderada a alta; y las plantas son de crecimiento indeterminado por lo que se manejan con sistema de tutoreo y podas frecuentes. Dichas características pueden aún mejorarse a través de cruza dialélicas entre las ocho líneas sobresalientes. Las ventajas de identificar híbridos de crusa simple sería la obtención de materiales iguales o superiores a sus progenitores y de gran uniformidad en las características mencionadas (Pérez y Castro, 2012).

2.3 Marcadores moleculares

El desarrollo de marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada exclusivamente en el análisis del fenotipo, así como a la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetible. Un marcador molecular es cualquier característica química o molecular medible que es heredable según el modelo mendeliano y que puede ser monomórfico o polimórfico, incluyen aquellos que analizan directamente a los ácidos nucleicos así como sus productos, por ejemplo las proteínas y que se pueden relacionar con un rasgo genético (Ferreira, 1998). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando se presentan diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico.

Se utilizan varios tipos de marcadores de ADN para evaluar el polimorfismo genético y generalmente se clasifican como marcadores basados en hibridación y marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en campos de investigación como la biología, la biomedicina, ciencias forenses y estudios de biodiversidad. Son indispensables ya que gracias a ellos se pueden localizar y aislar genes de interés que posteriormente pueden ser empleados en programas de mejoramiento genético. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por

su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Ferreira, 1998). Además, reducen el tiempo de identificación de genotipos con características asociadas a dichos marcadores genéticos sin necesidad de esperar su madurez y prueba en ambientes diferentes, actualmente se consideran una herramienta complementaria para los programas de mejoramiento genético (Valadez-Moctezuma y Kahl, 2005).

2.3.1 ISSR

La técnica ISSR (inter-secuencias simples repetidas), reportada por Zietkiewicz *et al.* (1994), es un método basado en PCR, que consiste en la amplificación del segmento de ADN presente a una distancia amplificable entre dos regiones de repetición de microsatélite idénticas orientadas en dirección opuesta. La técnica utiliza microsatélites, generalmente de 16 a 25 pb de longitud, como cebadores en una reacción de PCR de cebador único dirigida a múltiples loci genómicos para amplificar principalmente las secuencias inter-SSR de diferentes tamaños. Las repeticiones de microsatélites utilizadas como cebadores pueden ser di-nucleótido, tri-nucleótido, tetra-nucleótido o penta-nucleótido. Los cebadores utilizados pueden estar sin anclar (Gupta *et al.*, 1994) o más generalmente anclados en el extremo 3' o 5' con una a cuatro bases degeneradas extendidas (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los marcadores ISSR no requieren conocimiento previo sobre las secuencias a amplificar y muestran un alto polimorfismo, segregan principalmente como marcadores dominantes siguiendo la herencia mendeliana simple (Gupta *et al.*, 1994). Este tipo de marcador molecular es empleado para conocer aspectos de diversidad genética intra e interpoblacional (Dávila *et al.*, 2007) y relaciones genéticas y procesos evolutivos entre especies (Du *et al.*, 2002). También proporcionan información biogeográfica, así como características ecológicas de las especies o colecciones de germoplasma sobre las cuales se desea trabajar (Wallace, 2003). El ISSR-PCR es un método sencillo y rápido que combina las

mejores ventajas de los microsatélites, los AFLP y la universalidad del RAPD (Pradeep Reddy *et al.*, 2002).

2.3.2 RFLPs

Los RFLP (Restriction fragment length polymorphism- polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) se detectan mediante el uso de enzimas de restricción que cortan moléculas de ADN genómico en secuencias de nucleótidos específicas (sitios de restricción), lo que produce fragmentos de ADN de tamaño variable. La identificación de los fragmentos de ADN genómico se realiza mediante Southern blotting, un procedimiento mediante el cual los fragmentos de ADN, separados por electroforesis, se transfieren a un filtro de nitrocelulosa o nailon (Southern, 1975). El ADN inmovilizado en el filtro se deja hibridar con el ADN de la sonda marcada radiactivamente. Las sondas suelen ser pequeños (500 a 3000 pares de bases (pb)) segmentos de ADN clonado (por ejemplo, genómico o ADNc). El filtro se coloca contra la película fotográfica, donde la hibridación con la sonda radiactiva produce bandas visibles. Tales bandas son visualizaciones de RFLPs, que son marcadores codominantes.

En *Capsicum*, los RFLP se han utilizado para mapear el gen responsable de los colores rojo y amarillo CCS (capsantina-capsorubina sintasa) y, a través de la mutación inducida, se ha observado que su eliminación aumenta la intensidad del color amarillo en los frutos y se activa específicamente durante las etapas finales de la maduración (Lefebvre *et al.*, 1998).

2.3.3 RAPDs

Los marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - ADN polimórfico amplificado al azar) se generan mediante la amplificación por PCR de segmentos aleatorios de ADN genómico con cebadores únicos, generalmente de 10 nucleótidos de secuencia arbitraria (Williams *et al.*, 1990). Los polimorfismos,

detectados como segmentos de ADN que amplifican en un progenitor pero no en otro, son heredados de forma Mendeliana en 90 % de los casos, y pueden ser utilizados para construir mapas genéticos de gran variedad de especies.

Estos marcadores han sido utilizados con éxito para diferenciar especies cuando no se cuenta con información previa de secuencias. Sin embargo, una de sus desventajas es que requieren de la optimización del experimento, con objeto de conseguir reproducibilidad en los resultados. El desarrollo posterior de la metodología RAPD ha producido otros marcadores basados en PRC, por ejemplo, marcadores SCAR (regiones amplificadas con secuencia caracterizada) y ASAP (iniciadores específicos asociados con alelos).

En *Capsicum annuum* los marcadores RAPD ayudaron en la identificación varietal y la prueba de pureza genética, dónde se identificaron cuatro RAPD específicos para tres variedades híbridas y 11 RAPD como útiles para determinar la pureza de las semillas, especialmente para el control de calidad de semillas (Ilbi, 2003). Además, mediante el uso de RAPD, se determinó que se produjo la separación entre poblaciones silvestres y domesticadas de *C. annuum* en el norte de México, lo que sugiere que la selección artificial, que interviene en diferentes direcciones, produce cambios a nivel genético (Oyama *et al.*, 2006).

2.3.4 AFLPs

Los Polimorfismos de Fragmentos Amplificados de Diferente Longitud (AFLP) se basan en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción (Zabeau, 1993) . Se generan múltiples bandas en cada reacción de amplificación que contiene marcadores de ADN de origen aleatorio. Los AFLP son cuantitativos, ya que los genotipos heterocigotos y homocigotos pueden diferenciarse por la intensidad de las bandas amplificadas. La capacidad de esta tecnología para generar muchos marcadores con pruebas mínimas de cebadores, y la alta resolución del sistema son características que hacen que los AFLP sean atractivos como marcadores genéticos (principalmente dominantes).

Los AFLP se han usado para mapear el gen que determina el picor (locus C del cromosoma 2) en las poblaciones de progenitores y F2 desarrolladas por *C. frutescens* (picante) × *C. annuum* var. *grossum* (no picante) (Blum *et al.*, 2003).

2.3.5 Microsatélites

Los marcadores de repetición de secuencia simple (SSR), o microsatélite, detectan diferencias en la longitud de las secuencias de repetición de mono a hexa-nucleótido. Los marcadores de SSR constituyen una herramienta útil para el análisis de diversidad genética, ya que permiten la detección de alelos múltiples, son altamente transferibles entre las especies y son lo suficientemente flexibles para que puedan usarse con varios sistemas de laboratorio. Los marcadores de SSR se pueden clasificar en dos categorías: SSR genómicas y EST-SSR, que se diseñan a partir de secuencias de transcripción del genoma completo y ARNm, respectivamente (Kalia *et al.*, 2011).

Se han desarrollado marcadores SSR útiles para el mapeo y la selección asistida por marcadores en el mejoramiento genético de especies de *Capsicum*, y un mapa de vinculación que proporciona un mapa genético de referencia para estas especies (Minamiyama *et al.*, 2006).

2.3.6 SNPs

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism-Polimorfismos de un solo nucleótido) son la técnica de genotipificación más nueva y altamente automatizada que puede detectar cambios en las secuencias de nucleótidos mediante una sustitución de una base y polimorfismos en posiciones de una sola base. Dicha variación es muy común en el genoma, por lo tanto, los SNP son muy abundantes. Los SNP utilizan cadenas de ADN incrustadas en alguna superficie sólida como chips de silicio o microarreglos, y son láseres vinculados con computadoras que detectan la variación (Staub *et al.*, 1996).

En *Capsicum* se logró la identificación de 31 accesiones, que representaron seis especies, mediante la detección de variaciones alélicas de marcadores SNPs a través del análisis de fusión de alta resolución (HRM), el método resultó útil para la identificación de germoplasma nuevo (Jeong *et al.*, 2010).

2.4 Agrupamiento de genotipos

Los marcadores moleculares han contribuido a los estudios de divergencia y relación filogenética entre y dentro de especies vegetales de interés agrícola, con aplicaciones en la organización del germoplasma, así como mejoramiento y genética de plantas. En estos estudios se utilizan técnicas multivariadas, como el análisis de conglomerados o agrupamientos, para la representación simplificada de los resultados. El preámbulo de dichos análisis es la construcción de una matriz de similitud (o distancia) entre los genotipos evaluados (Duarte *et al.*, 1999).

Las variables registradas de marcadores moleculares dominantes (RAPDs o ISSRs) son cualitativas. En cada posición relativa de una banda se tienen dos opciones, asignar un 1 en caso de presencia y 0 para la ausencia. Lo anterior genera las siguientes posibilidades para dos genotipos *r* y *s*:

		Genotipo <i>s</i>		
		1	0	
Genotipo <i>r</i>	1	a	b	a+b
	0	c	d	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d

El número de coincidencias positivas (1,1) se representa por *a*, y *d* es el número de coincidencias doble cero. Las discordancias (1,0) y (0,1) son representadas por *b* y *c*, respectivamente. Con base en estas opciones se han construido varios coeficientes de similitud S_{rs} y la distancia (disimilitud) está dada por $d_{rs}=1-S_{rs}$ (Khattree y Naik, 2000).

2.5 Literatura citada

- Aguilera, J. G., Pessoni, L. A., Rodrigues, G. B., Elsayed, A. Y., Silva, D. J. H. da, & Barros, E. G. de. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=119018545009>
- Blum, E., Mazourek, M., O'Connell, M., Curry, J., Thorup, T., Liu, K., ... Paran, I. (2003). Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(1), 79–86. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1405-y>
- Dávila, M., Castillo, M. A., & Laurentín, H. (2007). Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y variabilidad intraespecífica en *Agave*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 33(1), 93–111. https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Uso+de+marcadores+moleculares+ISSR+para+inferir+las+relaciones+gen%C3%A9ticas+y+variabilidad+intraespec%C3%ADfica+en+Agave&btnG=
- Duarte, J. M., Santos, J. B. dos, & Melo, L. C. (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3), 427–432. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000300024>
- Du, J.K., Yao, Y.Y., Ni, Z.F., Peng, H.R., & Sun, Q.X. (2002). Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compactum and progeny of recurrent selection. *Yi Chuan Xue Bao. Acta Genética Sinica*, 29(5), 445–452. <https://europepmc.org/abstract/med/12043574>
- Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Federal District, Brazil: Embrapa. 220 p.
- Gupta, S., Swinton, J., & Anderson, R. M. (1994). Theoretical studies of the effects of heterogeneity in the parasite population on the transmission dynamics of malaria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 256(1347), 231–238. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0075>
- Griffing, B. (1956). A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1038/hdy.1956.2>

- Ibarra-Torres, P., Valadez-Moctezuma, E., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Campos, J., & Jaramillo-Flores, M. E. (2015). Inter- and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 181, 137–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.054>
- Ilbi, H. (2003). RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. *Scientia Horticulturae*, 97(3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00158-9)
- Jeong, H.-J., Jo, Y. D., Park, S.-W., & Kang, B.-C. (2010). Identification of *Capsicum* species using SNP markers based on high resolution melting analysis. *Genome*, 53(12), 1029–1040. <https://doi.org/10.1139/G10-094>
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309–334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
- Khattree, R., & Naik, D. N. (2000). *Multivariate Data Reduction and Discrimination with SAS Software*. SAS Publishing. Cary, N.C., U.S.A.
- Lefebvre, V., Kuntz, M., Camara, B., & Palloix, A. (1998). The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Molecular Biology*, 36(5), 785–789. <https://doi.org/10.1023/A:1005966313415>
- Martínez, E. I. (2016) Caracterización morfológica y molecular de 15 colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del Estado de México. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México, México). Consultada en <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/99720/TEISIS%20MAESTRÍA.%20IMELDA%20MARTÍNEZ%20ESTRADA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Melchinger, A. E., & Gumber, R. K. (1998). Overview of Heterosis and Heterotic Groups in Agronomic Crops. *Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants*, (eds Lamkey, K. R. and Staub, J. E.). Crops Science Society of America, Madison, WI, pp. 29–44. <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub25.c3>
- Mimura, Y., Inoue, T., Minamiyama, Y., & Kubo, N. (2012). An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding Science*, 62(1), 93–98. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.62.93>
- Minamiyama, Y., Tsuro, M., & Hirai, M. (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18(2), 157–169. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9024-3>

- Oyama, K., Hernández-Verdugo, S., Sánchez, C., González-Rodríguez, A., Sánchez-Peña, P., Garzón-Tiznado, J. A., & Casas, A. (2006). Genetic Structure of Wild and Domesticated Populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Northwestern Mexico Analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(3), 553–562. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-2363-1>
- Paran, I., Aftergoot, E., & Shifriss, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 99(3), 167–173. <https://doi.org/10.1023/A:1018301215945>
- Pérez, G. M. y R. Castro B. 2012. El chile manzano. Segunda reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. 128 p.
- Prince, J. P., Lackney, V. K., Angeles, C., Blauth, J. R., & Kyle, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, 38(2), 224–231. <https://doi.org/10.1139/g95-027>
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9–17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- Rodriguez, J. M., Berke, T., Engle, L., & Nienhuis, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s001220051219>
- Shirasawa, K., Ishii, K., Kim, C., Ban, T., Suzuki, M., Ito, T., ... Tabata, S. (2013). Development of *Capsicum* EST–SSR markers for species identification and in silico mapping onto the tomato genome sequence. *Molecular Breeding*, 31(1), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9774-z>
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503–517. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80083-0)
- Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience*, 31(5), 729–741. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.5.729>
- Thul, S. T., Darokar, M. P., Shasany, A. K., & Khanuja, S. P. S. (2012). Molecular Profiling for Genetic Variability in *Capsicum* Species Based on ISSR and RAPD Markers. *Molecular Biotechnology*, 51(2), 137–147. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9446-y>
- Valadez-Moctezuma, E. y Kahl, G. 2005. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-prensa México, S. A. de C. V. Distrito Federal, México. 147 p.

- Valadez-Moctezuma, E. (2015). Comparación de huellas de dna en hoja y fruto de *Capsicum* spp.: inferencia de polinización cruzada. *AgroProductividad*, 8(1). Recuperado de <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/640>
- Wallace, L. E. (2003). Molecular Evidence for Allopolyploid Speciation and Recurrent Origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 164(6), 907–916. <https://doi.org/10.1086/378658>
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Zabeau, M. (1993). Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application* 92402629.7. Recuperado de <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012136811/>
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS, HÍBRIDOS Y COLECTAS DE CHILE MANZANO

3.1 RESUMEN

El análisis de la variabilidad genética del germoplasma de un programa de mejoramiento genético permite definir las estrategias necesarias para conservar, utilizar y enriquecer esta variación. La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar líneas, híbridos y colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) mediante marcadores moleculares ISSR's, con el fin de determinar el grado de variabilidad genética de este germoplasma e identificar grupos genéticamente distantes para definir estrategias en la generación de híbridos, tanto intervarietales, como de cruce simple. Los marcadores moleculares ISSR caracterizaron adecuadamente líneas, híbridos y colectas de chile manzano a partir de 20 iniciadores; se generaron 296 productos amplificados, de los cuales 210 permitieron diferenciar genotipos (70.9 % de polimorfismo). Análisis multivariados generaron cinco grupos para líneas avanzadas, siete para híbridos de cruce simple derivados de las líneas, seis para colectas y siete en el análisis general, con distancia genética promedio de 0.77, 0.71, 0.65 y 0.74 respectivamente. Se detectó variabilidad genética entre las líneas estudiadas, por lo que se considera que la cruce entre líneas de grupos distantes genéticamente, podrían generar híbridos de cruce simple sobresalientes. Lo anterior debido a que los híbridos sobresalientes se ubicaron en grupos distintos a los de sus respectivos progenitores; mismos que también difirieron en su ubicación dentro de grupos. La mayoría de las colectas (26) se diferenciaron de líneas e híbridos, y dentro de ellas fue posible subdividir las en seis subconjuntos. Esto sugiere la posibilidad de cruzamientos intervarietales de grupos distintos; o bien que a partir de estas poblaciones se generen nuevas líneas para la conformación de híbridos de cruce simple.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, caracterización, marcadores moleculares, ISSR.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LINES, HYBRIDS AND COLLECTIONS OF MANZANO HOT PEPPER

3.2 ABSTRACT

The analysis of the genetic variability of the germplasm of a genetic improvement program allows to define the necessary strategies to conserve, use and enrich this variation. The objective of the present investigation was to characterize lines, hybrids and collections of Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.) by means of ISSR's molecular markers, in order to determine the degree of genetic variability of this germplasm and identify genetically distant groups for define strategies in the generation of hybrids, both intervarietal, and simple cross. The ISSR molecular markers adequately characterized lines, hybrids and Manzano hot pepper collections from 20 primers; 296 amplified products were generated, of which 210 allowed to differentiate genotypes (70.9% of polymorphism). Multivariate analyses generated five groups for advanced lines, seven for single-cross hybrids derived from the lines, six for collections and seven in the general analysis, with average genetic distance of 0.77, 0.71, 0.65 and 0.74 respectively. Genetic variability was detected among the lines studied, so it is considered that the crossing between lines of genetically distant groups could generate hybrids of outstanding single crosses. This was due to the fact that the outstanding hybrids were located in groups different from those of their respective parents; They also differed in their location within groups. Most of the collections (26) were differentiated from lines and hybrids, and within them it was possible to subdivide them into six subsets. This suggests the possibility of intervarietal crosses of different groups; or that from these populations new lines are generated for the conformation of single-cross hybrids.

Keywords: *Capsicum pubescens*, characterization, molecular markers, ISSR.

3.3 INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Capsicum* (Solanaceae) se originó en América Central y América del Sur, con las especies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense* (Shirasawa, 2003). El chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es una planta perenne y de media sombra, originaria de las partes altas de Bolivia, Perú y Chile, se puede encontrar desde Argentina hasta el centro de México. En México fue introducido a mediados del siglo XX, y se encuentra en altitudes de 1700 a 2500 m, principalmente en los estados de Puebla, Michoacán, Veracruz, Estado de México y Chiapas, donde se le aprecia por su sabor y picor. En esos Estados puede encontrarse variabilidad en cuanto a tipo de crecimiento de la planta, color, tamaño y forma de fruto (Pérez y Castro, 2012).

Actualmente, en México, se cultivan 1,500 hectáreas de chile Manzano con incremento en la demanda de esta especie tanto en México como en Estados Unidos de América. Por esa razón se han desarrollado sistemas de producción para condiciones de invernadero y paralelamente estudiado la genética y fisiología de este cultivo, particularmente, a través del Programa de Producción y Mejoramiento Genético de Chile Manzano de la Universidad Autónoma Chapingo, desde 1994. El propósito del programa ha sido generar líneas e híbridos sobresalientes en rendimiento y calidad de fruto para satisfacer la demanda de un mercado creciente y exigente en cuanto a las cualidades organolépticas del fruto.

El proceso de selección de líneas puras como progenitores de híbridos de alto rendimiento y calidad de fruto que se realizan en los programas de mejoramiento genético de plantas usualmente requiere: a) identificación de grupos heteróticos, b) realización de cruzamientos entre líneas de diferentes grupos heteróticos y c) evaluación de rendimiento y características agronómicas de los híbridos generados (Melchinger y Gumber, 1998). Lo anterior implica la necesidad de conocer la variación fenotípica y genotípica existente en una colección de germoplasma.

El programa de mejoramiento genético de chile manzano cuenta con líneas avanzadas (F_7) e híbridos de cruce simple que se ha generado a través cruzamientos dialélicos (Griffing, método II). Estos genotipos han sido

caracterizados morfológicamente con base a la guía técnica para la descripción de variedades de chile manzano, considerando caracteres de tallo, hoja, flor y fruto. Lo anterior ha permitido conocer la variación fenotípica existente y la identificación de materiales sobresalientes. Sin embargo, también es necesario conocer la variabilidad genotípica de líneas e híbridos existentes en el programa así como la de nuevos genotipos provenientes de colectas, para contribuir en la eficiencia del proceso de mejoramiento genético de esta especie.

La variación genotípica de especies vegetales puede explorarse mediante marcadores moleculares de forma rápida, precisa y eficiente (Aguilera *et al.*, 2011). Se han estudiado especies del género *Capsicum* utilizando marcadores moleculares como RAPD y AFLP para analizar las relaciones genéticas entre y dentro de las especies (Paran *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1999), también la variación genética interespecífica empleando RFLP (Prince *et al.*, 1995), SSR para desarrollar mapas genéticos (Mimura *et al.*, 2012), y entre ellos, ISSR para generar perfiles moleculares y evaluar la variabilidad genética (Thul *et al.*, 2012; Ibarra-Torres *et al.*, 2015). Particularmente, los marcadores ISSR no requieren conocimiento previo del genoma y generan alto polimorfismo con alta eficiencia para diferenciar el germoplasma de especies silvestres, además de los estudios de origen (Aguilera *et al.*, 2011).

Específicamente en *C. pubescens* se compararon huellas de ADN genómicas en hoja y fruto para estimar el grado de entrecruzamiento ocurrido en diferentes ambientes en plantas experimentales, y los marcadores ISSR permitieron estimar el porcentaje de polinización cruzada, comparando la información genómica de ambas estructuras (Valadez-Moctezuma, 2015). Por otro lado, en el estudio de caracterización morfológica y molecular de *C. pubescens* se encontró variabilidad cualitativa y cuantitativa suficiente en 15 colectas evaluadas que podrían emplearse para los programas de mejoramiento genético de esta especie (Martínez, 2016).

Con base en lo anterior, la presente investigación se realizó con el propósito de caracterizar líneas, híbridos y colectas de chile manzano mediante marcadores moleculares ISSR's para identificar grupos de genotipos genéticamente distantes bajo la hipótesis de que estos marcadores son capaces de identificar polimorfismos.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en dos etapas, en la primera se generaron los híbridos de cruce simple y se colectaron genotipos silvestres en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Michoacán, y en la segunda, se realizó la caracterización molecular (huellas de ADN) de los genotipos mediante marcadores ISSR.

3.4.1 Sitio experimental

La investigación se llevó a cabo de agosto de 2017 a noviembre de 2018 en el invernadero del Programa de Mejoramiento Genético de Chile Manzano del Campo Agrícola Experimental y en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.4.2 Genotipos empleados

Líneas. Se emplearon nueve líneas avanzadas (F_7), obtenidas a partir de la selección de poblaciones segregantes de la cruce entre líneas interpoblacionales colectadas en 1994 (Cuadro 1); éstas se caracterizan por poseer rendimiento y calidad de fruto sobresaliente.

Híbridos. Se emplearon 17 híbridos de cruce simple (Cuadro 1), generados a partir de las líneas arriba mencionadas, todos ellos pertenecen al programa de Mejoramiento genético de Chile Manzano.

Colectas. Se emplearon 32 colectas provenientes de los Estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Michoacán (Cuadro 1). Estos genotipos presentaron variabilidad en cuanto a forma y tamaño de fruto. El color de frutos predominante en las colectas fue el amarillo, considerado el de mayor preferencia por el consumidor (Pérez y Castro, 2012).

CUADRO 1. Líneas, híbridos y colectas de chile manzano empleados en la caracterización molecular con marcadores ISSR.

UBC	Procedencia	Color de fruto	Genotipo
L1	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L2	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L3	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L4	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L8	Chapingo, México	Amarillo	Línea
VLC1	Chapingo, México	Amarillo	Línea
VLC2	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L7	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L2014	Chapingo, México	Amarillo	Línea
L1 x L3	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L3 x L2014	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L1 x L2014	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L2 x VLC1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L3 x VLC1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
VLC2 x VLC1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L3 x VLC2	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
VLC2 x L1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
VLC2 x L2014	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
VLC1 x L1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L2 x L4	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L3 x L4	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L3 x L8	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L4 x VLC2	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L4 x L8	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L4 x L1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
L8 x L1	Chapingo, México	Amarillo	Híbrido
TZPA	Zacapoaxtla, Puebla	Amarillo	Colecta
TZPR	Zacapoaxtla, Puebla	Rojo	Colecta
XZPA1	Zacapoaxtla, Puebla	Amarillo	Colecta
XZPA2	Zacapoaxtla, Puebla	Amarillo	Colecta
XZPA3	Zacapoaxtla, Puebla	Amarillo	Colecta
XZPR	Zacapoaxtla, Puebla	Rojo	Colecta
CA1	San Cristóbal, Chiapas	Amarillo	Colecta
CR4	San Cristóbal, Chiapas	Rojo	Colecta
CR5	San Cristóbal, Chiapas	Rojo	Colecta
CA6	San Cristóbal, Chiapas	Amarillo	Colecta
CA7	San Cristóbal, Chiapas	Amarillo	Colecta

Continuación **CUADRO 1.**

UBC	Procedencia	Color de fruto	Genotipo
CA8	San Cristóbal, Chiapas	Amarillo	Colecta
CA9	San Cristóbal, Chiapas	Amarillo	Colecta
VA1	Hautusco, Veracruz	Amarillo	Colecta
VA3	Hautusco, Veracruz	Amarillo	Colecta
VA4	Hautusco, Veracruz	Amarillo	Colecta
VA6	Hautusco, Veracruz	Amarillo	Colecta
VAO8	Orizaba, Veracruz	Amarillo	Colecta
VR7	Hautusco, Veracruz	Rojo	Colecta
PA1	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA2	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA3	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA4	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA5	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA6	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA7	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PA8	Teziutlan, Puebla	Amarillo	Colecta
PR9	Teziutlan, Puebla	Rojo	Colecta
PR10	Teziutlan, Puebla	Rojo	Colecta
MA2	Morelia, Michoacan	Amarillo	Colecta
MA3	Morelia, Michoacan	Amarillo	Colecta
MA4	Morelia, Michoacan	Amarillo	Colecta

UBC: unidad básica de caracterización

3.4.3 Extracción de ADN

Los 58 genotipos de chile manzano se sembraron en bandejas de poliestireno de 200 cavidades con turba como sustrato. Entre 40 y 50 días después de la siembra se obtuvieron muestras de tejido de hojas tiernas, verdes y sin daño aparente. Se utilizó el protocolo de extracción de CTAB para la obtención de ADN. Las hojas se lavaron con alcohol al 70 % y se pesaron 0.6 g de tejido. El tejido se colocó en un mortero, se le agregó nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino, que fue transferido a 600 µL de amortiguador de extracción (Tris HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 2-mercaptoetanol 0.2 %, CTAB 2 %, pH 8.0)

contenidos en un microtubo de 1.5 mL precalentado a 65 °C en un termoblock marca Thomas Scientific®. El microtubo se agitó hasta homogeneizar; enseguida se calentó nuevamente a 65 °C en el termoblock durante 20 min. Posteriormente se colocaron en una centrifuga marca Thermo® durante 10 min a 21000 gravedades.

Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 600 µL de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente se centrifugó a 21000 gravedades por 5 min; se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 mL y agregó 4 µL de ARNasa, se incubó 20 min a temperatura ambiente o a 37 °C. A continuación se agregó 600 µL de Fenol frío; se agitó por inversión suavemente hasta obtener una emulsión. Se centrifugó a 21000 xg por 5 min, se separó el sobrenadante y colocó en otro microtubo y se agregó 600 µL de Cloroformo frío, se agitó por inversión suavemente. Nuevamente se centrifugó a 21000 xg por 5 min, se separó el sobrenadante y colocó en otro microtubo y se agregó 600 µL de Isopropanol frío, se agitó por inversión suavemente hasta obtener el precipitado de los ácidos nucleicos. Los tubos se colocaron a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó a 21000 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla y se escurrió sobre una toalla sanita. Se secó la pastilla en el termoblock a 40 °C durante aproximadamente 15 minutos y finalmente esta se disolvió en 50 µL de TE y se almacenó a 4 °C.

3.4.4 Cuantificación de la pureza y calidad del ADN

Para cuantificar la pureza del ADN se utilizó un espectrofotómetro “NanoDrop Lite” de “Thermo Scientific” para la cual se tomaron 4 µL de ADN disuelto en amortiguador TE. Las lecturas se registraron en $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y absorbancia a 280 nm. Las soluciones de trabajo se prepararon a una concentración final de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y se calculó a partir de las lecturas obtenidas con la ecuación: $C_1V_1=C_2V_2$, usando agua de grado Biología Molecular.

La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 2.0 % y TAE al 0.5 % de 4 mm de grosor. En cada pozo se depositarán 10 µL de la solución de trabajo

con ADN. La electroforesis se realizó por 40 min. El gel se tiñó con solución de bromuro de etidio a una concentración de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 15 min. Después se documentó mediante un transluminador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP. El ADN de muestras que generon manchas demasiado tenues u oscuras se concentró o diluyó, respectivamente, y se repitió el gel de calidad. Este proceso se repitió hasta que se generaron manchas uniformes. Además se realizó una prueba de amplificación mediante PCR del gen 16s y electroforesis de las muestras en gel de agarosa al 1.5% para verificar la amplificación del ADN como tercera prueba de calidad.

3.4.5 PCR condiciones de amplificación y separación de fragmentos

Se realizaron las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) con 20 iniciadores (Bojinov *et al.*, 2008) (Cuadro 2). Para cada genotipo se marcó un microtubo Eppendorf, se agregaron 2.5 μL del ADN diluido a $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 22.5 μL de mezcla de reacción a los tubos marcados, para tener un volumen final de 25 μL . La mezcla de reacción consistió de: 5.2 μL de H_2O grado Biología Molecular, 10.0 μL de dNTP's [500 μM], 2.5 μL de amortiguador [10 x], 1.5 μL de MgCl_2 [50 mM], 3.0 μL de iniciador [$10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$], y 0.3 μL de enzima Taq DNA polimerasa [$5 \text{ u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$]. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo FTC41H2D marca TECHNE, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 93°C por 1 min; seguido de cuarenta ciclos, cada uno con: 20 s a 93°C , 60 s a la temperatura del iniciador (Cuadro 2) y 20 s a 72°C ; una extensión final a 72°C por 6 min. Para concluir la muestra se enfrió hasta 4°C .

CUADRO 2. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de líneas, híbridos y colectas de chile manzano.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Ta (°C)	NB
ISSR1	CACACACACACACAAAGG	60	20
ISSR2	CACACACACACACAAAGCT	60	21
ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	58	19
ISSR4	AGAGAGAGAGAGAGAGCTC	58	19
ISSR5	ACACACACACACACACCTA	60	19
ISSR6	ACACACACACACACACCTG	58	19
ISSR8	ACACACACACACACACCTT	56	19
ISSR9	AGAGAGAGAGAGAGAGC	50	17
ISSR10	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	17
MELS2	GAGAGAGAGAGAGAGG	56	14
PI04	CTCTCTCTCTCTCTAGC	58	19
PHV6	CCACTCTCTCTCTCTCTCT	60	19
PHV7	GTGGTGTGTGTGTGTGTGT	60	19
17898B	CACACACACACAGT	48	14
LOL7	GAGAGAGAGAGACC	48	14
LOL8	GTGTGTGTGTGTCC	56	14
LOL12	GTGGTGGTGGC	48	11
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	17
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	60	18
UBC827	ACACACACACACACACG	52	17
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52	17

Ta=Temperatura de alineamiento, A=adenina, G=guanina, C=citocina, T=timina y NB=número de bases.

3.4.6 Análisis de geles

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 150 V por 40 min, para posteriormente ser teñidos con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y TAE 1 X) durante 15 min y hacer su documentación con luz UV en el fotodocumentador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP. Los genotipos se identificaron como se muestra en el Anexo 1.

El análisis de los geles obtenidos se realizó al comparar las similitudes y las diferencias en los patrones de bandeo, asignando el valor 0 a la ausencia y 1 a la presencia de cada banda polimórfica. Se cuantificó el número de bandas polimórficas producto de la amplificación para cada iniciador, asignándose un número de acuerdo con la distancia (pb) de migración en el gel, construyendo una matriz básica de datos (MBD).

3.4.7 Análisis estadístico

Para el análisis molecular se construyó una matriz básica de datos (MBD) de presencia-ausencia de bandas con los 20 iniciadores. A partir de los datos moleculares se obtuvo la matriz de disimilitud de Jaccard (1912), y se contruyeron dendrogramas con el método de la varianza mínima de Ward. La altura de corte se decidió con base en la Pseudo Estadística T^2 (Hotelling, 1951) y la Pseudo F (Johnson, 1998).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Análisis de los patrones de marcadores ISSR

Se amplificaron 296 bandas, 210 fueron polimórficas (Cuadro 3). Del total de bandas polimórficas solo 108 (51.4 %) se emplearon para el análisis de distancias genéticas ya que fueron las que presentaron porcentajes de variación entre el 10 y 90 % en los 58 genotipos estudiados. El número de bandas por iniciador varió desde 5 (UBC827) hasta 56 (ISSR3), con un promedio de 14.09. Estos datos difieren comparados con los de Ibarra-Torres *et al.* (2015), que muestran la amplificación de 15 a 23 bandas por iniciador, con un promedio de 19, reportaron un alto nivel de polimorfismo (95.65 %); sin embargo solo 25 % de iniciadores utilizados generaron bandas polimórficas, el número total de bandas fue de 38. En otros resultados Ahmed (2013) obtuvo la amplificación de 87 bandas, de las cuales 52 fueron polimórficas (60 %), el número de bandas por iniciador varió de 5 a 13 con un promedio de 8.7 bandas por iniciador, todos los iniciadores empleados generaron polimorfismo. En el presente trabajo el 70 % de iniciadores generó bandas polimórficas, y amplificaron en promedio 12.3 bandas por ISSR polimórfico y el porcentaje general de polimorfismo fue de 70.9 % (con un mínimo de 12.5 y un máximo de 100 %).

Los iniciadores en cuya secuencia de aminoácidos se incluyó la adenina en combinación con guanina o citosina (GA, AG, CA, AC) generaron el mayor número de bandas y sobre todo bandas polimórficas (Cuadro 3). Los iniciadores UBC (809, 827, 811) generaron muy pocas o cero bandas polimórficas, respecto de los demás iniciadores empleados. Estos resultados difieren con los encontrados por Patel *et al.* (2011), en donde muestran 100 % de polimorfismo y el UBC 809 fue uno de los mejores con 34 bandas polimórficas en la evaluación de la relación genética en cultivos de *Capcicum annum* L.

CUADRO 3. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización de la divergencia genética de 58 genotipos de chile manzano, temperatura de alineamiento empleada (Ta), número total de bandas amplificadas (NTBA), número de bandas polimórficas (NBP), porcentaje de polimorfismo (PP) y porcentaje de monomorfismo (PM).

Iniciador	Secuencia	NTBA	NBP	PP (%)	PM (%)
ISSR1	(C A) ₈ A A G G	29	29	100	0
ISSR2	(C A) ₈ A A G C T	11	11	100	0
ISSR3	(G A) ₈ C T C	56	56	100	0
ISSR4	(A G) ₈ C T C	12	12	100	0
ISSR5	(A C) ₈ C T A	26	26	100	0
ISSR6	(A C) ₈ C T G	26	26	100	0
ISSR8	(A C) ₈ C T T	11	7	63.7	36.3
ISSR9	(A G) ₈ C	8	0	0	100
ISSR10	(G A) ₈ T	7	0	0	100
MELS2	(G A) ₆ G G	7	2	28.5	71.5
PI04	(C T) ₈ A G C	17	17	100	0
PHV6	C C A (C T) ₈	14	12	85.7	14.3
PHV7	(G T G) ₂ (T G) ₆ T	6	0	0	100
17898B	(C A) ₆ G T	6	0	0	100
LOL7	(G A) ₆ C C	9	0	0	100
LOL8	(G T) ₆ C C	9	2	22.2	77.8
LOL12	(G T G) ₃ G C	8	1	12.5	87.5
UBC809	(A G) ₈ G	8	2	25	75
UBC866	(C T C) ₆	12	7	58.3	46.2
UBC827	(A C) ₈ G	5	0	0	100
UBC811	(G A) ₈ C	9	0	0	100
Total		296	210	70.9	29.1

Bases: A=adenina, G=guanina, C=citosina y T=timina.

La Matriz Básica de Datos (MBD) fue utilizada para calcular la matriz de distancias genéticas de Jaccard (1912), entre pares de individuos. A partir de la matriz anterior se obtuvieron dendrogramas contruidos para distancias genéticas de Jaccard, con el método de agrupamiento de la varianza mínima de Ward. La técnica empleada es de gran utilidad para determinar la variabilidad genética en plantas autógamas como el chile manzano, ya que en el presente estudio y en los de Ahmed (2013), el polimorfismo detectado permitió clasificar genotipos evaluados en forma adecuada.

3.5.2 Análisis del agrupamiento de líneas

Resultado de los marcadores obtenidos es el dendrograma de la Figura 1. La pseudo estadística T^2 sugirió cinco grupos. Al trazar la línea de corte en $0.105 r^2$ semiparcial, se observan cinco conjuntos de líneas homocigóticas, agrupadas con base en su disimilitud o distancia genética. La distancia genética promedio fue de 0.77. La mayor disimilitud (0.89) fue entre las líneas L2 y VLC2, la línea L7 también registró el segundo valor más disímil (0.88) en su combinación con las línea VLC2. En contraste, las líneas más parecidas fueron la L2014 y L7 con una disimilitud de 0.64, lo que indica que comparten el mismo origen genético. Otras líneas con alto parentesco son L8 y L4 con 0.65 de disimilitud. Los cinco grupos definidos en el dendrograma quedaron constituidos de la siguiente forma; dos grupos con solo un genotipo, dos con dos genotipos y uno por tres (Cuadro 4).

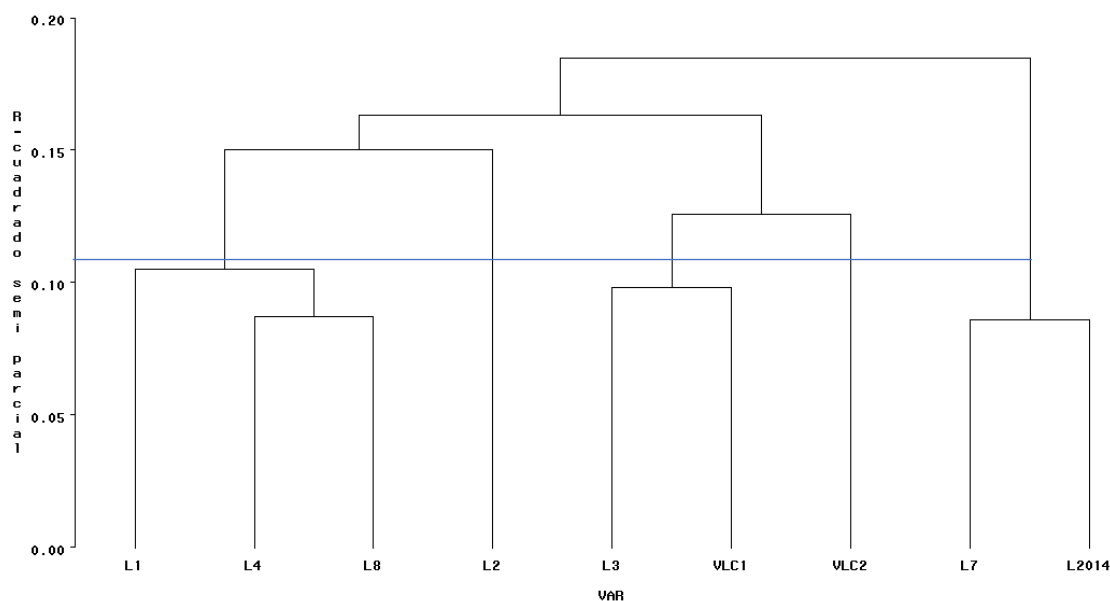


FIGURA 1. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para nueve líneas avanzadas de chile manzano.

Todos los conglomerados se construyeron con materiales de crecimiento indeterminado, frutos de 3 a 4 lóculos y color de fruto amarillo. En cuanto a

rendimiento, Facundo (2014) encontró que los genotipos del grupo cinco presentaron un número reducido de frutos (24 a 36), menor precocidad y la línea L4 el rendimiento más bajo de ocho líneas evaluadas, sin embargo, fueron los de mayor calidad de fruto. El grupo tres incluye al genotipo con mejor rendimiento por planta (L3) y con precocidad intermedia.

CUADRO 4. Agrupamiento de nueve líneas de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.

Grupo	Genotipos
1	L7, L2014
2	VLC2
3	L3, VLC1
4	L2
5	L1, L4, L8

Por otra parte, Potrero (2016) determinó que la línea L3 tuvo la mayor aptitud combinatoria general (ACG) para rendimiento de fruto con 4463.20 g por planta, por lo que se puede considerar como progenitor potencial para generar híbridos de alto rendimiento, ya sea de manera directa como progenitor o como fuente de germoplasma de nuevas líneas de alta ACG. Las líneas del grupo cinco (Figura 1) tuvieron la mayor ACG para peso promedio de fruto, al generar frutos de peso superior a 90 g, y se clasifican como grandes para el mercado de exportación.

Los resultados anteriores indican que existe divergencia genética entre las líneas evaluadas, y que es factible realizar cruzamientos entre genotipos de diferentes agrupamientos ya que son genéticamente contrastantes, y podrían generar híbridos iguales o superiores a sus progenitores en variables de rendimiento y calidad de fruto (Márquez, 1988).

3.5.3 Análisis del grupamiento de híbridos

En el agrupamiento de disimilitud genética de los 17 híbridos de cruce simple la pseudo estadística T^2 y la pseudo estadística F sugirieron siete grupos (Figura 2). Al trazar la línea de corte en 0.058 r^2 semiparcial, se observan siete conjuntos

de híbridos de cruce simple, agrupadas con base en su disimilitud o distancia genética. La distancia genética promedio fue de 0.71. La mayor disimilitud (0.90) fue entre los híbridos L8xL1, L4xL1 y VLC2xVLC1, el híbrido L4xL1 también registró el segundo valor más disímil (0.86) en su combinación con el híbrido L3xVLC1 y L7xL8 con el híbrido L3xL4. En contraste, los híbridos más parecidos fueron L3xVLC2 y VLC2xL1 con una disimilitud de 0.34, ambos comparten a la línea VLC2 como progenitor. Otros híbridos con alto parentesco son L3 x VLC2 y L2 x VLC1 ,con disimilitud de 0.38, L3 x L2014 y L1 x L3 con disimilitud de 0.42.

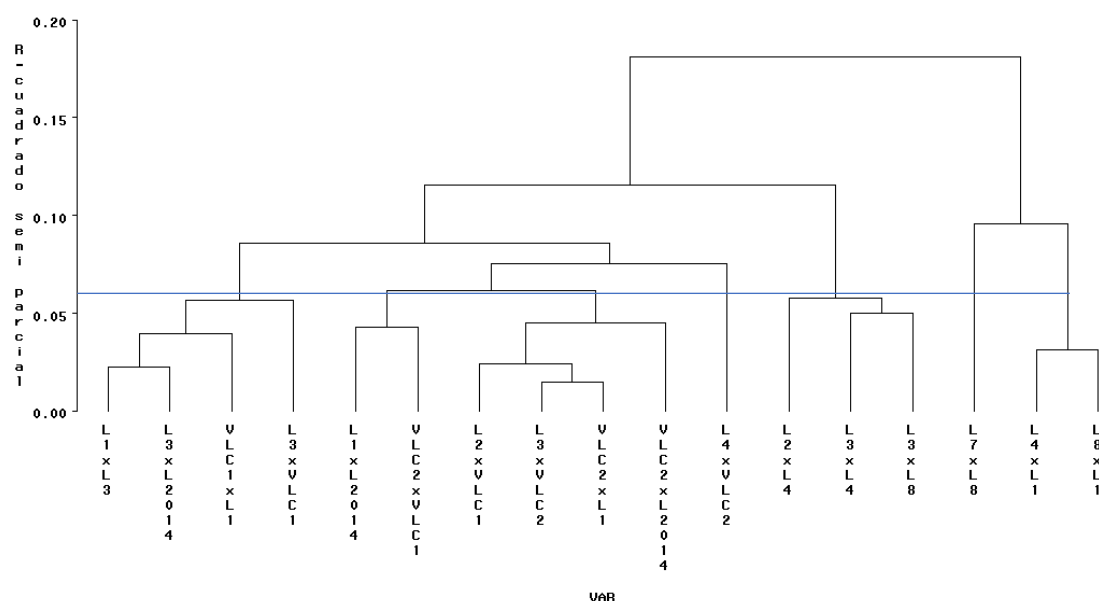


FIGURA 2. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para 17 híbridos de chile manzano.

Los siete grupos definidos en el dendrograma se enumeran en el Cuadro 5. El grupo uno se construyó por dos híbridos que tienen como progenitores a las líneas L1, L4 y L8, las cuales fueron ubicadas en un mismo grupo (Figura 1) en la caracterización molecular de líneas, y son resultado de cruzamientos entre genotipos con poca divergencia genética. El grupo dos y cuatro fueron los mas pequeños con sólo un genotipo. El conglomerado tres, cinco, seis y siete constaron de tres, cuatro, dos y cuatro híbridos, respectivamente. La mayoría

de los agrupamientos se contruyó de híbridos con progenitores distantes genéticamente.

Estos resultados indican que los marcadores encontrados (108 bandas polimórficas) fueron adecuados para diferenciar híbridos de cruce simple de chile manzano, al generar siete agrupamientos de acuerdo a su disimilitud genética. Estos resultados coinciden con los de Ahmed (2013), quien logró diferenciar adecuadamente híbridos de *C. Frutescens* e híbridos de *C. annuum* con 52 bandas polimórficas ISSR, a partir de 10 iniciadores.

En la caracterización morfológica de híbridos de chile manzano, en donde se incluyeron siete genotipos considerados en el presente estudio, en el análisis de agrupamiento, se determinó que tres fueron los adecuados con altura de corte de 0.13 r^2 semiparcial. El 78 % de la variabilidad entre genotipos fue explicada por los primeros cuatro componentes principales, los cuales fueron representados por grosor del pericarpio, número de lóculos, longitud del fruto, peso del fruto, longitud del pedúnculo del fruto, diámetro del pedúnculo, altura del tallo, longitud y número de entrenudos, longitud y ancho del limbo, longitud del peciolo, días a inicio de floración y días a madurez, considerados de utilidad para la caracterización de variedades de chile manzano (Potrero, 2016). De los híbridos considerados en el presente estudio (L8xL1, L4xL1, L7xL8, L3xL8, L3xL4, L2xL4 y L1xL3) en su caracterización morfológica los genotipos L3xL4, L7xL8 fueron ubicados en el mismo grupo (grupo III), en el grupo II (L1xL3, L4xL1 y L2xL4) y en el grupo I el híbrido L3xL8. Los resultados de Potrero, (2016) contrastaron con los obtenidos con marcadores moleculares del presente estudio, ya que los híbridos se agruparon en conglomerados distintos de acuerdo a su distancia genética (Cuadro 5).

CUADRO 5. Agrupamiento de 17 híbridos de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.

Grupo	Genotipos
1	L8xL1, L4xL1
2	L7xL8
3	L3xL8, L3xL4, L2xL4
4	L4xVLC2
5	VLC2xL2014, VLC2xL1, L3xVLC2, L2xVLC1
6	VLC2xVLC1, L1x2104
7	L3xVLC1, VLC1xL1, L3xL2014, L1xL3

En la evaluación de aptitud combinatoria y heterosis de rendimiento y calidad de fruto sobresalieron los híbridos L7xL8, L3xL8, L3xL4 y L1xL3, con potencial para ser utilizados comercialmente en la producción intensiva de este cultivo, principalmente para condiciones de invernadero (Potrero, 2016). Estos híbridos sobresalientes resultaron de la cruce de progenitores genéticamente distantes (Figura 1), así lo indican los resultados encontrados en este estudio. Los diez híbridos restantes considerados en esta investigación están siendo evaluados en un trabajo paralelo a éste.

3.5.4 Análisis del grupamiento de colectas

En el agrupamiento de disimilitud genética de 32 colectas la pseudo estadística T^2 y la pseudo estadística F generó seis grupos (Figura 3). Al trazar la línea de corte en 0.045 r^2 semiparcial, se observan seis conjuntos de colectas agrupadas con base en su disimilitud o distancia genética. La distancia genética promedio fue de 0.65. La mayor disimilitud (0.93) fue entre las colectas XZPR y TZPR, la colecta PA7 también registró el segundo valor más disímil (0.92) en su combinación con la colecta TZPR, las colectas CA6, PA3 y MA2 combinados con la TZPR también registraron valor alto de disimilaridad con 0.91. En contraste, las colectas más parecidas fueron la VA3 y VA1 con una disimilitud de 0.32. Otras colectas con alto parentesco son VA3 y CA9, VAO8 y VA6 con disimilitud de 0.34.

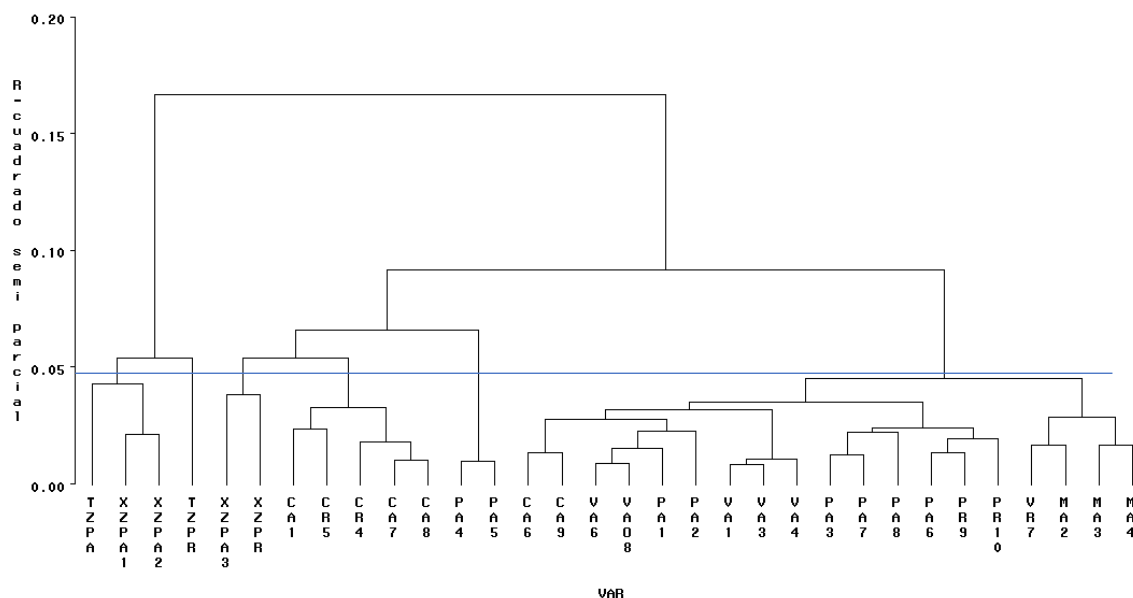


FIGURA 3. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (108 bandas polimórficas) derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para 32 colectas de chile manzano.

Los seis grupos definidos en el dendrograma se enumeran en el Cuadro 6. El grupo uno fue el mas numeroso con 19 colectas. El grupo dos, con dos genotipos provenientes del estado de Puebla. Los grupos tres y cuatro constaron de cinco y dos colectas, respectivamente. El grupo cinco fue el más pequeño con un genotipo (TZPR). El último agrupamiento constó de tres colectas. Tres conglomerados incluyeron genotipos con frutos de color predominantemente amarillos y al menos un genotipo de fruto color rojo.

CUADRO 6. Agrupamiento de 32 colectas de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.

Grupo	Genopitos
1	MA4, MA3, MA2, VR7, PR10, PR9, PA6, PA8, PA7, PA3, VA4, VA3, VA1, PA2, PA1, VAO8, VA6, CA9, CA6
2	PA5, PA4
3	CA4, CA8, CR4, CR5, CA1
4	XZPR, XZPA3
5	TZPR
6	XZPA2, XZPA1, TZPA

Si bien la mayoría de las colectas procedentes de la misma región tienden a agruparse, existe presencia de colectas de zonas diferentes dentro de un grupo específico (Figura 3); por lo que es probable que compartan áreas de adaptación con características edáficas y climáticas semejantes; lo que explica la mayor similitud en su constitución genética.

Los resultados indican variabilidad en la constitución genética de los genotipos colectados, ya que se construyeron seis agrupamientos, principalmente en aquellos provenientes de comunidades de Zacapoaxtla, Puebla; las cuales se agruparon en tres conglomerados. Las mayoría de colectas procedentes de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, se diferenciaron de genotipos de los estados de Puebla, Veracruz y Michoacán. Los resultados anteriores también sugieren que es factible realizar selección de genotipos de cada grupo de colectas, agrupados en los conglomerados con base en su distancia genética, de acuerdo con caracteres de interés para el programa de mejoramiento genético de la UACH y generar líneas a través de varios ciclos de autofecundación para cada una de ellas.

3.5.5 Análisis conjunto de líneas, híbridos y colectas

Resultado de los marcadores obtenidos (108 bandas polimórficas) se muestran en el dendrograma de la Figura 4. La pseudo estadística T^2 y la pseudo estadística F sugirieron siete grupos (Figura 5). Al trazar la línea de corte en 0.025 r^2 semiparcial, se observan siete conjuntos de genotipos, agrupadas con base en su disimilitud o distancia genética. La distancia genética promedio fue de 0.74. La mayor disimilitud (0.94) fue entre la colecta PA5 en combinación con el híbrido L2xL4 y la colecta MA4 con el híbrido VLC2xVLC1. La colecta XZPR con TZPR registraron el segundo valor más disímil (0.93), ambas de Zacapoaxtla, Puebla. En contraste, los genotipos más parecidos fueron las colectas VA3 y VA1 con una disimilitud de 0.32, lo que indica que comparten el mismo origen genético, ambas colectas procedentes de Huatusco, Veracruz. Otros genotipos con alto

Detailed description of the dendrogram: The dendrogram illustrates the genetic relationships between 48 samples. The y-axis, labeled 'R-cuadrado semi parcial', indicates the distance between clusters, ranging from 0.00 to 0.25. A horizontal blue line is positioned at a distance of approximately 0.03. The samples are grouped into two primary clusters that merge at a distance of about 0.21. The left cluster is composed of several sub-groups, including samples L1-L12, X1-X4, T1-T4, V1-V4, and P1-P4. The right cluster includes samples L13-L24, X5-X8, T5-T8, V5-V8, P5-P8, and M1-M4. The labels for each sample are listed below the x-axis, with some labels having subscripts (e.g., L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L22, L23, L24, X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, M1, M2, M3, M4).

46

El grupo uno aglomeró a la mayoría de las colectas al construirse con 19 genotipos. El grupo dos, se construyó con 5 genotipos, incluye dos colectas y tres híbridos. El grupo tres constó de ocho genotipos, en este agrupamiento se incluye a la línea L7 y a la mayoría de las colectas de Chiapas. Los grupos cuatro, seis y siete se construyeron de seis, nueve y ocho genotipos, respectivamente. El grupo cinco fue el más pequeño con sólo tres genotipos (Cuadro 7).

En el dendrograma, general, de disimilitud la mayoría de los híbridos se agruparon en un mismo conglomerado (grupo 6), también ocurrió lo mismo con las colectas (grupo 1), las líneas se distribuyeron en cinco grupos distintos. Las colectas originarias de Zacapoaxtla, Puebla y dos de Teziutlán, en el que se incluyen genotipos de frutos rojos y amarillos, compartieron agrupamientos (4 grupos) con las líneas e híbridos. Esto probablemente se deba al origen de los progenitores ya que son líneas que se derivaron de poblaciones segregantes del híbrido intervarietal “Grajales ST” que resultó del cruzamiento de un genotipo de Zongolica, Veracruz con otro de Puebla, por lo que de acuerdo con los resultados comparten cierto grado de similitud genética (Cuadro 9).

CUADRO 7. Agrupamiento de 9 líneas, 17 híbridos y 32 colectas de chile manzano. Distancia de Jaccard y método de la varianza mínima de Ward.

Grupo	Genotipos
1	MA4, MA3, MA2, VR7, PR10, PR9, PA6, PA8, PA7, PA3, VA4, VA3, VA1, PA2, PA1, VAO8, VA6, CA9, CA6
2	L8xL1, L2014, L4xL1, PA5, PA4
3	CA8, CA7, CR4, CR5, CA1, L7, XZPR, XZPA3
4	L2xL4, VLC2, TZPR, L3xL8, L3xL4, L3
5	XZPA2, XZPA1, L2
6	VLC2xL2104, VLC2xL1, L3xVLC2, L2xVLC1, VLC2xVLC1, L1xL2104, VLC1xL1, L3xL2104, L1xL3
7	TZPA, L3xVLC1, L4xVLC2, VLC1, L8, L4, L7xL8, L1

Claramente las colectas de Chiapas, Veracruz, Puebla (Teziutlan) y Michoacán distan genéticamente con la mayoría de las líneas e híbridos que existen actualmente en el programa de mejoramiento genético de esta especie en la UACh, lo que sugiere que, de derivarse líneas a través de la selección de

individuos sobresalientes de estas colectas, podrían realizarse cruzamientos con las líneas avanzadas ya existentes y generar nuevos híbridos de cruza simple. O bien podrían generarse híbridos interpoblacionales a partir de las colectas contrastantes.

Al respecto, Pérez-Grajales *et al.* (2009) en la evaluación de la aptitud combinatoria y heterosis en rendimiento y calidad de frutos de chile manzano criollo, encontraron valores significativos de heterosis en algunos híbridos intervarietales para rendimiento de fruto (Zongolica x Puebla), volumen de fruto (Perú x Chiapas), número de semillas por fruto (Puebla x Perú), peso de semillas y número de lóculos (Puebla x Chiapas) y el mejor progenitor fue 'Puebla'.

3.6 Discusión general

En el presente estudio la caracterización molecular detectó diversidad genética, a través de polimorfismos, entre y dentro de líneas, híbridos y colectas de chile manzano. Generó diferentes patrones de agrupamiento de acuerdo a su distancia genética, esto contribuye a definir esquemas de cruzamientos para la generación de híbridos, tanto intervarietales, como de cruza simple.

Genotipos genéticamente contrastantes podrían generar híbridos iguales o superiores a sus progenitores en variables de rendimiento y calidad de fruto según lo propuesto por Falconer y Mackay (1996) y Márquez (1988). Pérez-Grajales *et al.* (2009) proponen que la hibridación es un método conveniente en el mejoramiento genético del chile manzano para explotar la aptitud combinatoria específica (ACE) y heterosis. En este sentido, de acuerdo con la caracterización molecular, entre las líneas con mayor distancia genética (igual o mayor a 0.80), de las nueve evaluadas, podrían realizarse 16 cruza simples de las 36 posibles (Cuadro 8), en un diseño dialélico que no considere las cruza recíprocas que corresponden al método II de Griffing (Griffing, 1956). De las 16 cruza, la L2xLVLC2 y LVCL2xL7 son los genotipos que tienen los progenitores (líneas) más distantes con 0.89 y 0.88, respectivamente. Lo anterior tiene la ventaja de reducir los costos en la evaluación de híbridos generados y la posibilidad de

elevar la eficiencia del programa de mejoramiento genético de este tipo de chile ya que solo se considerarían el 44 % del total de cruzas.

CUADRO 8. Cruzas sugeridas entre líneas de chile manzano con base en disimilitud genética superior a 0.80.

Líneas	L1	L2	L3	L4	L8	LVLC1	LVLC2	L7	L2014
L1	.	.	.	.	.	.	.	.	.
L2	NC	.	.	.	.	.	.	.	.
L3	SI	NC	.	.	.	.	.	.	.
L4	NC	SI	NC	.	.	.	.	.	.
L8	NC	SI	SI	NC	.	.	.	.	.
LVLC1	NC	SI	NC	NC	NC	.	.	.	.
LVLC2	SI	SI	NC	NC	NC	NC	.	.	.
L7	NC	SI	NC	NC	SI	SI	SI	.	.
L2014	NC	SI	SI	NC	SI	SI	SI	NC	.

NC: no considerado

Por otra parte, de las 32 colectas evaluadas en este estudio, las de Zacapaoxtla del Estado de Puebla TZPA (Tatoxcac del municipio de Zacapaoxtla, Puebla, fruto amarillo), TZPR (Tatoxcac del municipio de Zacapaoxtla, Puebla, fruto rojo), XZPA1 (Xalticpac del municipio de Zacapaoxtla, Puebla, fruto amarillo) y ZXPA2 (Xalticpac del municipio de Zacapaoxtla, Puebla, fruto amarillo) se diferenciaron genéticamente de 24 colectas. Especialmente la colecta TZPR registró la mayor disimilitud genética con los genotipos XZPR (0.93) y PA7 (0.92). Las mejores colectas para ser consideradas en la generación de híbridos interpoblaciones así como para generar líneas puras potenciales serían: TZPA, TZPR, XZPA1, XZPA2 por su alto valor de distancia genética, la primera tiene su mayor distancia con tres colectas, la segunda con 23, la tercera con 11 y la cuarta con tres (Cuadro 9).

CUADRO 9. Colectas con potencial para generar líneas o cruzas intervarietales de chile manzano con base en su disimilitud genética

Colectas para generar híbridos o líneas puras	Colectas o genotipos distantes
TZPA	PA4, PA5, MA4
TZPR	XZPR, CR4, CR5, CA6, CA8, CA9, VA1, VA3, VA4, VAO8, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8, PR9, PR10, VR7, MA2, MA3, MA4
XZPA1	VA3, VA6, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7, PA8, PR9, PR10, MA4
XZPA2	PA3, PA4, PR10

Con el propósito de generar nuevas líneas a partir de las colectas y que éstas sean genéticamente contrastantes con las que actualmente existen en el programa de mejoramiento de la UACH, se proponen las cobinaciones de líneas y colectas mostradas en el Cuadro 10. Al considerar las distancias genéticas igual o superior a 0.85, al menos existen, en promedio, diéz colectas distantes para cada línea. Del conjunto de posibles combinaciones, las más sobresalientes serían entre los genotipos L1xPA7, L1xVR7, L2xXZPR, L8xPR10 y L8xMA4 debido a que su disimilitud genética se encuentra entre 0.90 a 0.92.

CUADRO 10. Relación genética entre líneas y colectas de chile manzano.

Líneas	Colectas distantes
L1	XZPR, CA6, CA9, VA4, VAO8, PA3, PA6, PA7, PR9, PR10, VR7, MA2, MA4
L2	XZPR, CA1, CA6, VA1, VA6, VAO8, PA4, PA5, PA6, PA7, PR10, VR7, MA2.
L4	XZPR, CA8, VAO8, PA3, PA7, PR10
L8	XZPA1, XZPR, CA6, CA8, VA1, VA4, PA3, PA4, PA7, PR9, PR10, VR7, MA4
LVLC1	TZPR, MA4
LVLC2	TZPR, XZPR, VAO8, PA3, PA5, PA6, PR10, VR7, MA2, MA3, MA4

Los marcadores moleculares ISSR permitieron agrupar adecuadamente líneas, híbridos y colectas de chile manzano de acuerdo con su disimilitud genética. La información generada será de utilidad para el programa de mejoramiento genético de esta especie, sobre todo, como en este caso, para identificar genotípos genéticamente contrastastes que puedan ser empleados en la

generación de híbridos intervarietales y de cruza simple. Sin embargo la caracterización molecular debe complementarse con estudios de caracterización morfológica con el propósito conferir certeza en la clasificación ya que la similitud fenotípica necesariamente no es producto de la similitud genotípica, sino a que diferentes pool de genes pueden generar fenotipos similares (Demey, Zambrano, Fuenmayor, & Segovia, 2003).

3.7 CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares ISSR's identificaron grupos de genotipos genéticamente distantes entre y dentro de líneas, híbridos y colectas de chile manzano a través de 14 iniciadores que generaron 210 bandas polimórficas.

Los genotipos con mayor disimilitud genética 0.89 y 0.88, fueron L2 con LVLC2 y LVCL2 con L7, respectivamente, y se proponen para formar nuevos híbridos de cruza simple de chile manzano.

De 32 colectas evaluadas, cuatro de Zacapoaxtla, Puebla, fueron las de mayor disimilitud genética y podrían emplearse para generar híbridos intervarietales o líneas puras en el programa de mejoramiento genético de chile manzano de la UACH.

3.8 LITERATURA CITADA

- Aguilera, J. G., Pessoni, L. A., Rodrigues, G. B., Elsayed, A. Y., Silva, D. J. H. da, & Barros, E. G. de. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=119018545009>
- Ahmed, S.M. (2013). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in the evaluation of genetic polymorphism of Egyptian *Capsicum* L. hybrids. *African Journal of Biotechnology* Vol. 12(7), pp. 665-669, DOI: 10.5897/AJB12.2838. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/126664>
- Bojinov, B. M., & Danailov, Zh. P. (2009). Applicability of issrs for genotype identification in a tomato breeding collection. *Acta Horticulturae*, (830), 63–70. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.830.6>
- Demey, J. R., Zambrano, A. Y., Fuenmayor, F., & Segovia, V. (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia*, 28(12), 684–689. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442003001200004&script=sci_arttext&tlng=en
- Facundo, A. P. 2014. Rendimiento y calidad de fruto de ocho líneas de chile Manzano (*Capsicum pubescens* R & P). Tesis de licenciatura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo 33 p.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman. Harlow Essex, England. 437 p.
- Griffing, B. (1956). A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1038/hdy.1956.2>
- Hotelling, H. (1951). A generalized T test and measure of multivariate dispersion. *Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. The Regents of the University of California. Recuperado de <https://projecteuclid.org/euclid.bsmsp/1200500217>
- Ibarra-Torres, P., Valadez-Moctezuma, E., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Campos, J., & Jaramillo-Flores, M. E. (2015). Inter- and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 181, 137–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.054>
- Jaccard, P. (1912). the distribution of the flora in the alpine zone.1. *New Phytologist*, 11(2), 37–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>

- Johnson, E. D. (1998). Applied Multivariate, Methods for data Analysts. USA: Cole Publishing Company.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Applied%20multivariate%20methods%20for%20data%20analysts&publication_year=1998&author=D.E%20Johnson
- Márquez, S. F. 1988. Genotecnia vegetal. Métodos Teoría Resultados. Tomo II. A.G.T. Editores, S.A. México. 665 p.
- Martínez, E., I.(2016) Caracterización Morfológica y Molecular de 15 Colectas de Chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la Region Sur del Estado de Mexico. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México, México). Consultada en <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/99720/TESIS%20MAESTRÍA.%20IMELDA%20MARTÍNEZ%20ESTRADA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Melchinger, A. E., & Gumber, R. K. (1998). Overview of Heterosis and Heterotic Groups in Agronomic Crops. *Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants*, (eds Lamkey, K. R. and Staub, J. E.). Crops Science Society of America, Madison, WI, pp. 29–44.
<https://doi.org/10.2135/cssaspecpub25.c3>
- Mimura, Y., Inoue, T., Minamiyama, Y., & Kubo, N. (2012). An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding Science*, 62(1), 93–98.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.62.93>
- Paran, I., Aftergoot, E., & Shifriss, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 99(3), 167–173.
<https://doi.org/10.1023/A:1018301215945>
- Patel, A. S., Sasidharan, N., & Vala, A. G. (2011). Research article genetic relation in *Capsicum annuum* L. cultivars through microsatellite markers: SSR and ISSR. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 2(1), 67-76.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.205.560&rep=rep1&type=pdf>
- Pérez-Grajales, M., González-Hernández, V. A., Peña-Lomelí, A., & Sahagún-Castellanos, J. (2009). Combining ability and heterosis for fruit yield and quality in manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Revista chapingo serie horticultura*, 15(1), 103-109.
<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=60913518015>
- Pérez, G. M. y R. Castro B. 2012. El chile manzano. Segunda reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. 128 p.
- Potrero, A. S. 2016. Caracterización morfológica, poscosecha, aptitud combinatoria y heterosis en híbridos de chile manzano (*Capsicum*

- pubescens* Ruíz y Pavón). Tesis de doctorado, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, 97p.
- Prince, J. P., Lackney, V. K., Angeles, C., Blauth, J. R., & Kyle, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, 38(2), 224–231. <https://doi.org/10.1139/g95-027>
- Rodriguez, J. M., Berke, T., Engle, L., & Nienhuis, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s001220051219>
- Thul, S. T., Darokar, M. P., Shasany, A. K., & Khanuja, S. P. S. (2012). Molecular Profiling for Genetic Variability in *Capsicum* Species Based on ISSR and RAPD Markers. *Molecular Biotechnology*, 51(2), 137–147. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9446-y>
- Valadez-Moctezuma, E. (2015). Comparación de huellas de dna en hoja y fruto de *Capsicum* spp.: inferencia de polinización cruzada. *AgroProductividad*, 8(1). Recuperado de <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/640>