

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

**Variabilidad bioquímica y molecular de 5 accesiones promisorias de chile
habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Daniela Solís Marroquín

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México.
Febrero, 2008



CONTENIDO

| | |
|--|----------|
| Agradecimientos | i |
| Dedicatoria | ii |
| Lista de cuadros | iii |
| Lista de figuras | iv |
| Lista de abreviaturas | vi |
| Resumen | viii |
| Abstract | ix |
| Introducción | 1 |
| Bibliografía | 3 |
| Capítulo I. Antecedentes | 5 |
| 1 El chile (<i>Capsicum spp.</i>) | 5 |
| 1.1 Origen, distribución y clasificación | 5 |
| 1.2 El chile habanero (<i>C. chinense</i>) | 5 |
| 1.2.1 Importancia económica | 5 |
| 1.2.2 Acciones de chile habanero | 6 |
| 1.2.3 Problemática | 7 |
| 1.3 Marcadores genéticos en la identificación de variedades | 7 |
| 1.3.1 Marcador genético | 7 |
| 1.3.2 Tipos de marcadores genéticos usados en la identificación de variedades | 7 |
| 1.3.2.1 Marcadores morfológicos | 7 |
| 1.3.2.2 Marcadores bioquímicos | 8 |
| 1.3.2.2.1 Proteínas de reserva | 8 |
| 1.3.2.2.1.1 Determinación del contenido en proteínas mediante el método de Bradford | 9 |
| 1.3.2.2.1.2 Separación electroforética (SDS-PAGE) en gradientes de geles de poliacrilamida | 10 |
| 1.3.2.2.2 Isoenzimas | 10 |
| 1.3.2.3 Marcadores moleculares | 11 |
| 1.3.2.3.1 RAPD | 12 |
| 1.3.2.3.2 AFLP | 12 |
| 1.3.2.3.3 STS | 13 |
| 1.3.2.3.4 Minisatélites | 13 |
| 1.3.2.3.5 Secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites | 13 |
| 1.4 Marcadores bioquímicos y moleculares empleados en plantas | 15 |
| 1.5 Marcadores bioquímicos y moleculares usados en la identificación varietal en plantas con referencia especial a <i>Capsicum</i> | 20 |
| 1.6 Hipótesis y objetivos | 24 |
| Hipótesis | 24 |
| Objetivos | 24 |
| Bibliografía | 25 |

| | |
|--|--|
| Capítulo II. Materiales y métodos | 29 |
| 2.1 | Material vegetal 29 |
| 2.2 | Metodología 31 |
| 2.2.1 | Marcadores bioquímicos 31 |
| 2.2.1.1 | Determinación del contenido de proteínas 31 |
| 2.2.1.2 | Determinación de la composición de proteínas totales 31 |
| 2.2.2 | Establecimiento de la técnica de microsatélites (SSR) y RAPDs en chile habanero 33 |
| 2.2.2.1 | Método de extracción de ADN 33 |
| 2.2.2.2 | Método de amplificación para SSR 34 |
| 2.2.2.3 | Método de amplificación para RAPDs 38 |
| 2.2.2.4 | Detección de productos amplificados 39 |
| 2.2.3 | Análisis de datos 40 |
| | Bibliografía 41 |
| Capítulo III. Resultados y discusiones | 43 |
| 3.1 | Variación en el contenido de proteínas totales 43 |
| 3.1.1 | Semillas 43 |
| 3.1.2 | Hojas 44 |
| 3.2 | Variación en la composición de proteínas totales 45 |
| 3.2.1 | Semillas 45 |
| 3.2.2 | Hojas 48 |
| 3.3 | Variación molecular 51 |
| 3.3.1 | SSR 51 |
| 3.3.2 | RAPDs 54 |
| 3.3.3 | Comparación de la utilidad de los marcadores 58 |
| 3.4 | Clasificación molecular 58 |
| 3.4.1 | Clasificación bioquímica y molecular por análisis de conglomerado 58 |
| | Bibliografía 62 |
| Capítulo IV. Discusión general | |
| 4 | Discusión general 63 |
| | Bibliografía 64 |
| Capítulo V. Conclusiones y perspectivas | 65 |
| 5.1 | Conclusiones 65 |
| 5.2 | Perspectivas 65 |

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy, a quien agradezco su apoyo y asesoría por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, y a la Dra. Lourdes Iglesias quien me coasesoró y orientó en mi trabajo experimental y documental durante el transcurso de mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (No. de registro 204997).

A los miembros de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dra. Nancy Santana, Dra. Lourdes Iglesias, Dr. Felipe Barahona, Dr. Víctor Suárez y Javier O. Mijangos por sus opiniones aportadas para la realización de este trabajo de investigación.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto: "Selección de genotipos de chile habanero con mayor tolerancia a plagas y enfermedades que afectan al cultivo en la región, dentro de una colecta de especies conservadas en el CICY" (II Parte-clave 5605) por la Fundación Produce Yucatán y por el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI, clave: 185).

A mi grupo de trabajo: Eduardo, Adriana, Lupita, Susana, Jericó, Carlos y Eunice porque con su amistad y apoyo pude desarrollar mi proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A mi familia

Por su amor y apoyo incondicional para la realización de mis metas y objetivos

A Carlos

A quien amo y quien me da fortaleza en momentos difíciles de mi vida

LISTA DE CUADROS

CUADRO

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Características generales de los marcadores genéticos | 14 |
| 2 | Utilidad de los principales Marcadores Moleculares | 15 |
| 3 | Accesiones de chile habanero en estudio | 30 |
| 4 | Características morfológicas y productividad del fruto de 5 accesiones de chile habanero a partir de descriptores para <i>Capsicum</i> (IPGRI, Canto-Flick, 2007 y Montalvo-Peniche, 2007). | 30 |
| 5 | Características morfológicas de las semillas de 5 accesiones de chile habanero a partir de descriptores para <i>Capsicum</i> (IPGRI, Canto-Flick, 2007 y Montalvo-Peniche, 2007) | 30 |
| 6 | Secuencias de marcadores microsatélites (SSR) de <i>Capsicum</i> , marca Invitrogene (Lee <i>et al.</i> , 2004) | 35 |
| 7 | Secuencias de marcadores RAPDs (OPK), marca Tubek | 38 |
| 8 | Estadísticas descriptivas de la variación en el contenido de proteínas totales en semillas en chile habanero | 43 |
| 9 | Estadísticas descriptivas de la variación en el contenido de proteínas totales en hojas de chile habanero | 45 |
| 10 | Perfil de alelos obtenidos del análisis molecular en 5 accesiones de chile habanero utilizando 5 pares de microsatélites | 53 |
| 11 | Contenido de información polimórfica (CIP) y No. de alelos detectados en las accesiones de chile habanero con 2 loci microsatélites seleccionados | 54 |
| 12 | Perfil de alelos obtenidos del análisis molecular en 5 accesiones de chile habanero utilizando 5 RAPDs OPK | 56 |
| 13 | Contenido de información polimórfica (CIP) y No. de alelos detectados en las accesiones de chile habanero con 5 RAPDs seleccionados | 57 |
| 14 | Parámetros que permiten estimar la utilidad de cada sistema de marcadores | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | |
|--------|--|----|
| 1 | Procedimiento experimental seguido para el estudio bioquímico-molecular de 5 accesiones de chile habanero | 29 |
| 2 | Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovina (BSA) como estándar | 31 |
| 3 | Curva de calibración para calcular el peso molecular (en Daltones) mediante un marcador de peso molecular conocido | 33 |
| 4 | Electroforesis de evaluación de la calidad de ADN en agarosa al 1% con diferentes métodos. Carril: 1, A11 método Dellaporta (1980); 2, A11 método Montalvo (2007); 3, A11 método Doyle y Doyle (1990) y 4 A11 método Saghai-Marroof, <i>et al.</i> (1984) | 34 |
| 5 | Variación en el contenido de proteínas totales de semillas en 5 accesiones de chile habanero. ES: error estándar, ns: no significativo, $p < 0.05$. | 43 |
| 6 | Variación en el contenido de proteínas totales de hoja en 5 accesiones de chile habanero. ES: error estándar, ns: no significativo, $p < 0.05$. | 44 |
| 7 | Perfiles de bandas de proteínas totales en semillas de 5 accesiones de <i>Capsicum chinense</i> (SDS-PAGE: 12.5% -5% gel de separación/compactación). Carril: 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, marcador. Pt1, Pt2 y Pt3: regiones de movilidad electroforética. | 46 |
| 8 | Perfiles de bandas de proteínas totales en semillas de 5 accesiones de <i>Capsicum chinense</i> (SDS-PAGE: 15% -5% gel de separación-compactación). Carril 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, marcador. Pt1 y Pt2: regiones de movilidad electroforética. | 48 |
| 9 | Perfiles de bandas de proteínas totales en hojas de 5 accesiones de <i>Capsicum chinense</i> (SDS-PAGE: 12.5% -5% gel de separación-compactación). Carril 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, Marcador. Pt1, Pt2 y Pt3: regiones de movilidad electroforética. | 49 |
| 10 | Perfiles de bandas de proteínas totales en hojas de 5 accesiones de <i>Capsicum chinense</i> (SDS-PAGE: 15% -5% gel de separación-compactación). Carril 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, Marcador. Pt1, Pt2 y Pt3: regiones de movilidad electroforética. | 50 |
| 11 | Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 8). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11 | 51 |
| 12 | Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 6). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; C, control | 51 |
| 13 | Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 9). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. | 52 |

| | | |
|----|---|----|
| 14 | Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11 Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 4). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. | 52 |
| 15 | Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11 Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 7). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. | 53 |
| 16 | Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; C, control Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 3) en geles de agarosa al 3%. | 55 |
| 17 | Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 4) en geles de agarosa al 3%. | 55 |
| 18 | Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 11) en geles de agarosa al 3%. | 55 |
| 19 | Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 12) en geles de agarosa al 3%. | 56 |
| 20 | Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 19) en geles de agarosa al 3%. | 56 |
| 21 | Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas para su composición de proteínas totales de semilla. Grupos I y II. | 59 |
| 22 | Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas para su composición de proteínas totales de hoja. Grupos I y II. | 60 |
| 23 | Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas con SSR. Grupos I, II, III y IV. | 60 |
| 24 | Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas con RAPDs. Grupos I, II, III, IV y V. | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| A | Adenina |
| A11 | NP1EG |
| A.C. | Antes de Cristo |
| Ác. | Ácido |
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphisms |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| A-PAGE | Acidic polyacrylamide gel |
| Arg | Arginina |
| C | Citocina |
| ° C | Grado Centígrado |
| CAPS | Cleaved Amplified Polymorphic Sequences |
| CIP | Contenido de información polimórfica |
| cv | Cultivar |
| dNTPs | Nucleótidos trifosfatados |
| EMR | Multiple effective portion |
| Fig. | Figura |
| G | Guanina |
| His | Histidina |
| i.a. | Ingrediente activo |
| IM | Índice de Marcador |
| IEF | Isoelectric focusing |
| ID | Índice de diversidad |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática |
| ISSR | Inter Simple Sequence Repeat |
| IPGRI | International Plant Genetic Resources Institute |
| kDa | Kilo daltones |
| Lab. | Laboratorio |
| Lys | Lisina |
| M | Molar |
| N1 | Nux 02 |
| N5 | NP4EC |
| N9 | Campn |
| No. | Número |
| SAM | Selección asistida por marcadores genéticos |
| pb | Pares de bases |
| Pi | Nivel de Polimorfismo |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Phe | Fenilalanina |
| QTL | Quantitative Trait Loci |
| R17 | Rux 02 |
| RAPD | Random Amplified Polymorphism ADN |
| R _f | Movilidad relativa |

| | |
|----------|--|
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphisms |
| SAM | Selection Assisted Mark |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel |
| SSR | Simple Sequences Repeat |
| STMS | Sequence-tagged microsatellite sites |
| STS | Sequence-tagged sites |
| T | Timina |
| Taq | <i>Termophilus acuaticus</i> |
| TBE | Tris-borato-EDTA |
| Trp | Triptófano |
| Tys | Tirosina |
| U | Unidades |
| UPGMA | Unweighted pair group method average |
| uv | Ultravioleta |
| uS | Unidades Scoville |
| VNTR | Variable number of tandem repeats |
| v/v | Volumen/volumen |
| w/v | Peso/volumen |

RESUMEN

Dada la gran importancia económica que tiene el chile habanero tanto en el mercado nacional como internacional, así como la amplia diversidad genética que existe en la región, se ha venido desarrollando un programa de mejoramiento genético basado en el estudio, identificación y uso eficiente de los recursos genéticos existentes en Yucatán, México, considerado como centro de reserva genética de la especie *Capsicum chinense* Jacq. Como parte de ese proyecto general, se realizó este trabajo con el objetivo de caracterizar e identificar, bioquímica y molecularmente, cinco accesiones de chile habanero. Los resultados de este estudio tendrán un importante impacto tanto para el registro como para la protección de estos materiales genéticos, los cuales podrán ser registrados como variedades autóctonas de la región. Estas variedades preseleccionadas difieren entre sí por sus características morfológicas y agronómicas sobresalientes, así como por sus niveles de pungencia; sin embargo, no podríamos descartar que su comportamiento pudiera obedecer a la interacción del genotipo con el ambiente. De ahí, la importancia del estudio que nos planteamos en este proyecto de tesis. Se estableció un protocolo que permitió caracterizar la composición proteica mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, a partir de semillas y tejido foliar, se evaluó el polimorfismo bioquímico y la variación en el contenido de las proteínas totales de a partir de muestras de semilla y tejido foliar y se evaluó el polimorfismo molecular de ADN presente en cinco accesiones de chile habanero (Nux 02, NP4EC, Campn, NP1EG, Rux 02). El polimorfismo detectado se analizó de manera integral a partir de diferentes tipos de marcadores. No fueron detectadas diferencias estadísticas significativas en el contenido de proteínas totales, tanto en semilla como en hoja. El perfil de bandas al 12.5 y 5% (Separación-Compactación) mostró un porcentaje de polimorfismo total de 63.15% y 46.88% para semilla y hoja, respectivamente. Así mismo, los cebadores SSR específicos de *Capsicum* (6 y 9) revelaron un polimorfismo de 20% y 18%, respectivamente. Los polimorfismos detectados por los cebadores de RAPDs 3, 4, 11, 12 y 19 fueron: 87.5%, 60%, 44.44%, 61.53% y 58.33%, respectivamente. Por otra parte, el índice de diversidad genética, la porción múltiple efectiva y por ende el índice de marcador fueron mayores en los RAPDs que en los SSR. Finalmente, la clasificación molecular de las accesiones fue presentada en dos grupos para el tipo de marcador bioquímico. Se pudieron identificar accesiones amarillas, naranjas y rojas del resto, en general, con los marcadores moleculares. El trabajo de investigación realizado permitió diferenciar las cinco accesiones, además de generar un protocolo que puede ser recomendado para estudios de caracterización molecular de materiales genéticos de interés, de chile habanero.

ABSTRACT

Given the great economic importance that habanero pepper has both in the domestic market and internationally, as well as the extensive genetic diversity that exists in the region, a crop genetic improvement program has been developed based on the study, identification and efficient use of genetic resources found in Yucatan, México, regarded as a centre of a gene pool of the species *Capsicum chinense* Jacq. As a part of that overall project, this study was conducted with the objectives of characterize and identify, biochemical and molecularly five accessions of habanero pepper. The results of this study will have a major impact both for the legal registration and the protection of genetic material, which may be registered as native varieties of the region. These prescreened varieties differ for their morphological and agronomic characteristics, as well as their pungency levels but we could not discard that their behavior could be the expression of the genotype and environment interaction. Hence, the importance of the present study. A protocol that allowed the protein composition characterization from seeds and leaf tissue based in SDS-PAGE electrophoresis technique was established, the biochemical polymorphism and total protein content variation was assessed from seed and leaf tissue samples and the DNA molecular polymorphism of five accessions of habanero pepper (Nux 02, NP4EC, Campn, NP1EG, Rux 02) were evaluated. We analyzed holistically the polymorphism detected with different types of markers. No statistical significant differences were found in the total protein content among seed and leaf. The band profiles in gels of 12.5% and 5 (separation-compaction) showed a percentage of total polymorphism of 63.15% and 46.88% for seed and leaf, respectively. Likewise, the specific *Capsicum* SSR primers (6 and 9) revealed a polymorphism of 20% and 18%, respectively. The polymorphisms identified by the RAPDs primers 3, 4, 11, 12 and 19 were 87.5%, 60%, 44.44%, 61.53% and 58.33%, respectively. Moreover, the genetic diversity index, the effective portion multiple and thus the marker index were higher in RAPDs than SSR. Finally, the molecular classification of the accessions was clustered in two groups for the type of biochemical marker. We were able to identify the accessions yellow, orange and red from the rest, in general, with the molecular markers. The research carried out in this work to differentiate the five accessions and to generate a protocol that can be recommended for the molecular characterization of valuable habanero pepper genetic materials.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum*, perteneciente a las Solanáceas, incluye alrededor de 27 especies. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área comprendida entre Bolivia y Perú, donde se han encontrado semillas de formas ancestrales, que datan de más de 7,000 años, y desde donde se presume, se diseminó al resto del continente americano (Pickersgill, 1989).

Al menos, cinco de las especies de *Capsicum* son las más cultivadas en diferentes regiones: *Capsicum chinense* Jacq., cuyo cultivar es conocido como "chile habanero" y produce el ají más picante que se conoce; *Capsicum frutescens*, cuyo cultivar "Tabasco" es ampliamente utilizado para la elaboración de salsa picante; *Capsicum baccatum*, cuyo producto es conocido como ají andino, es cultivado en las zonas del altiplano; y *Capsicum pubescens*, cuyo cultivar "Rocoto" (Manzano o Siete Caldos), es muy apreciado por su sabor y su pungencia (picor) en algunas regiones de América (Pozo *et al.*, 1991).

El chile habanero (*C. chinense*) es originario de Sudamérica, pero en México es muy conocido, mayormente cultivado en las regiones de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco, aunque ya se ha ido extendiendo su cultivo a otras regiones del país.

Es una planta autógama (80 a 90%) y su fruto se caracteriza por el grado de pungencia, pudiendo llegar a ser muy elevada en algunos tipos de chile habanero, propiedad que los hace muy codiciados en muchas regiones del mundo. Esta sensación al paladar se la confiere su contenido de capsaicina. El método tradicional de estimar la pungencia es por determinación del valor recíproco de la dilución máxima que permita detectar pungencia al gusto; se expresa en unidades Scoville (uS), en honor del creador del método. Citamos algunos datos promedios que muestran la variación en el grado de picor en algunos cultivares: Pimientos, entre 0 (no detectable) a 500 uS; cv. Ortega 1.000 uS; cv. Jalapeño, entre 4.000 a 6.000 uS; cv. Cayena, entre 30.000 a 50.000 uS; y cv. Habanero 200.000 a 350.000 uS (Pozo, *et al.*, 1991).

La identificación de cultivares es importante para la protección de una variedad, pues debe demostrarse que es distinta de otras variedades existentes, y que es suficientemente uniforme y estable en sus características más relevantes (Palop-Esteban *et al.*, 2007). La electroforesis de proteínas es una importante herramienta para distinguir un análisis entre cultivares y especies relacionadas o cultivos de importancia agrícola. Ésta es ampliamente usada para checar la genealogía o identidad varietal y pureza de semillas con el propósito de registrar variedades de plantas y patentes útiles (Odeigah *et al.*, 1999).

El uso de marcadores moleculares como los microsatélites o SSR es necesario para el registro de variedades comerciales y la protección de los derechos

de obtentor de una variedad, dado a que los SSR son altamente polimórficos y son una herramienta para la variabilidad genética y el mejoramiento de plantas .

Los RAPDs son una herramienta útil para una evaluación directa de la variación del genotipo (Peteira *et al.*, 2001). El polimorfismo detectado con RAPDs asiste en la identificación correcta de una especie (interespecífica o intraespecífica). Las técnicas moleculares permiten a los investigadores identificar accesiones en los niveles taxonómicos, establecer diversidad relativa dentro y entre especies y localizar diversas accesiones para propósitos de fitomejoramiento.

La identificación del germoplasma es un componente importante de los programas avanzados de mejora genética que dependen de cruzas controladas o de la identificación correcta de los genotipos para los programas de propagación masal. Dada la importancia del chile habanero en la península de Yucatán y la falta de variedades promisorias se hace necesario contar con herramientas efectivas para la caracterización del germoplasma de este importante cultivo que brinden un estudio de diversidad genética.

En este estudio se compara la capacidad discriminante y eficiencia de diferentes tipos de marcadores bioquímicos y moleculares en el análisis genético de cinco genotipos elites de chile habanero.

BIBLIOGRAFÍA

Odeigah P.G.C., Oboh B. and Aghalokpe I.O. (1999). The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 46: 127–131.

Palop-Esteban M., González-Gúzman M. y Palomares-Hernández G. (2007). Diseño y análisis de marcadores moleculares para la diferenciación de cultivares de pimiento. *Escuela técnica superior de Ingenieros Agronomos*.

Peteira Belkis, Fernández E., Gonzáles-Chavez, Shagarodsky T. y Miranda Ileana. (2001). Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en variedades de tomate y especies salvajes relacionadas en Cuba. *Rav. Protección Veg.* 16 (2-3): 84-91.

Pickersgill, B. (1989). Pickersgill, B. 1989. Cytological and genetical evidence on the domestication and diffusion of crops within the Americas. 426-439.

Pozo-Campodonico, O., Montes- Hernández S. y Redondo-Juárez, E. (1991). Chile (*Capsicum* spp.), en R, Ortega, G. Palomino, F. Castillo, V. Gonzáles y M. Livera (eds.). *Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México*. Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C., México. 217-238.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. EL CHILE (*Capsicum spp.*).

1.1. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y CLASIFICACIÓN.

Las especies hortícolas de mayor importancia que se cultivan en Yucatán, se agrupan taxonómicamente en dos familias botánicas: Solanáceas y Cucurbitáceas, las cuales proporcionan una gama de frutos comestibles, que se consumen en fresco, aunque algunos también pueden industrializarse. Dentro de la familia de las Solanáceas se encuentran como cultivos el tomate y el chile.

El género *Capsicum*, al cual pertenecen todos los chiles cultivados, es originario de los trópicos de América. Las cinco especies domesticadas y sus parientes silvestres estuvieron confinadas en el Continente Americano en la época precolombina. Los primeros exploradores españoles y portugueses, encontraron los frutos tan pungentes que lo introdujeron rápidamente a Europa y Asia (Tun-Dzul, 2001).

Se han encontrado remanentes arqueológicos que han permitido determinar que las especies de este género se domesticaron en diferentes partes de América, principalmente en México (7,000 A. C.). Los centros de diversidad de las formas cultivadas de *C. annum* L. incluye a México y Centroamérica. Existen centros secundarios en el centro y sureste de Europa, en África, Asia y América latina.

Se indica como centros de origen de *C. frutescens* L. y *C. chinense* a Bolivia, Perú, sureste de Brasil, los Andes y Colombia, aunque algunos tipos también se pueden encontrar en África y el sureste de Asia, ya que fueron introducidos por los portugueses en la época Colonial.

La mayoría de las especies se encuentran en las tierras bajas de los trópicos, aunque existen variedades adaptadas a condiciones de altitudes de hasta 2,500 msnm, en los Andes, desde Bolivia hasta Colombia, en México y América Central, aunque dicha adaptación pudo ocurrir en la época postcolombina.

La clasificación taxonómica del chile habanero es la siguiente: Clase: Angiosperma, Subclase: Dicotyledonea, Superorden: Sympetala, Orden: Tubiforales, Familia: Solanáceae, Género: *Capsicum*, Especie: *C. chinense* Jacq.

1.2. EL CHILE HABANERO (*C. Chinense*).

1.2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA.

El chile habanero (*C. chinense* Jacq.), es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate. La superficie del cultivo se encuentra en la parte norte

del estado y contribuye en más del 90% del volumen de la producción estatal, que en su mayor parte se comercializa y consume en fresco, y sólo una pequeña parte se utiliza en la industria como materia prima para la elaboración de salsa picante.

El contenido nutricional del chile es alto, es fuente de vitaminas, particularmente de la C, de la vitamina A y en los tipos pungentes secos. La pungencia (lo picante) del chile habanero, es debida a su contenido de capsaicina, que es un alcaloide que se encuentra en las células de la placenta. También se puede mencionar que otro uso del fruto es la extracción de capsaicina para su uso en la industria farmacéutica y para elaborar aerosoles empleados en la defensa personal.

El potencial productivo para este cultivo bajo condiciones de riego, está determinado por la clase de suelo y la temperatura media anual; el factor pendiente no es tan limitativo. (Tun-Dzul, 2001). La superficie de cultivo del estado de Yucatán es cercana a las 400 ha y los rendimientos varían entre ocho y 12 ton/ha, en suelos pedregosos al norte del estado, y de 10 a 15 ton/ha en suelos mecanizados al sur (González-Estrada *et al.*, 2006).

1.2.2. ACCESIONES DE CHILE HABANERO.

Existen diversos tipos de chile habanero, los cuales se diferencian por el color del fruto cuando madura:

Habanero Amarillo (*Capsicum chinense* Jacq.). Se cultiva en la zona de Oxkutzcab, Yucatán. Sus frutos son puntiagudos, pungentes, de color amarillo, 2.5 cm de diámetro y 5 cm largo. También se ha encontrado recientemente un tipo de forma achatada y muy picoso.

Habanero Anaranjado (*Capsicum chinense* Jacq.). También se encuentra en la zona de Oxkutzcab, Yucatán. Es el más conocido y cultivado. Sus frutos son puntiagudos, pungentes, de color anaranjado, 2.5 cm de diámetro y 4 cm de largo.

Habanero Rojo (*Capsicum chinense* Jacq.) Se cultiva en la zona de Xocchel, Yucatán. El fruto es ovalado, puntiagudo, oscuro brillante de color rojo, 2 cm de diámetro y 4 cm de largo.

Habanero morado (*Capsicum chinense* Jacq.). También conocido en la región como "cubano". No se sabe que se cultive con fines comerciales, en el estado de Yucatán es raro encontrarlo. En Quintana Roo, se le encuentra en huertos familiares, es el más picoso y rústico que se conoce, sus frutos son de color púrpura de 2.5 cm de diámetro y 2 a 3 cm de largo.

Habanero blanco (*Capsicum chinense* Jacq.). Aunque este cultivar en estado maduro es de color rojo brillante, se diferencia del tipo habanero "rojo" por su color verde muy tenue, casi blanquecino, durante su estado inmaduro. Generalmente es de forma achatada. Se cultiva en la zona de Valladolid y Tizimín, Yucatán.

1.2.3. PROBLEMÁTICA.

El chile habanero en la península de Yucatán, región geográfica con la mayor diversidad genética, es de gran importancia económica (como ya se ha mencionado anteriormente). Se cuenta con alrededor de 100 accesiones en el banco de germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán (UBBM, en el Lab. de la Dra. Santana); colectadas en toda la península de Yucatán. Las accesiones se han caracterizado morfológicamente por descriptores establecidos para el género *Capsicum* (IPGRI, 1995). Así mismo, fue cuantificado el contenido de capsaicinoides totales presentes en fruto, placenta y pericarpio. Por lo anterior, se hace necesario contar con marcadores bioquímicos (proteínas de reserva) y moleculares (SSR y RAPDs) que identifiquen dichas accesiones. Las ventajas de la técnica de microsatélites en la identificación de variedades son permitir la caracterización de colecciones en bancos de germoplasma, eliminar duplicados, establecer colecciones de referencia y mantener la pureza de una línea. Estos marcadores proporcionarán el registro y protección de las variedades comerciales recomendadas por sus características (morfológicas, bioquímicas y moleculares) más relevantes, siendo estas uniformes y estables. La identificación de variedades constituye una herramienta legal para las empresas semilleras que busquen proteger su derecho de obtentor; teniendo así variedades endémicas de la región certificadas.

1.3. MARCADORES GENÉTICOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES.

1.3.1. MARCADOR GENÉTICO.

Un marcador es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, tipo de hoja, etc.) que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B (como vigor, altura, resistencia a enfermedades, etc.) puede considerarse como un marcador, pues la presencia de A necesariamente implica la de B.

1.3.2. TIPOS DE MARCADORES GENÉTICOS USADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES.

1.3.2.1. MARCADORES MORFOLÓGICOS.

Cualquier diferencia detectable entre dos individuos sirve como una "etiqueta" o "marcador" que se convertirá en un rasgo característico y propio de cada individuo o cierto grupo de individuos. Los marcadores más antiguos son los que se basan en caracteres morfológicos. Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica con un objetivo determinado.

Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población. Sin embargo, hay varias limitaciones para su uso, de las que la principal es precisamente que se basan en las características morfológicas o expresadas en el individuo (fenotipo), las cuales muchas pueden ser fuertemente influidas por el ambiente en el que se desarrollan, además de que generalmente sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos.

1.3.2.2. MARCADORES BIOQUÍMICOS.

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción, por lo que se ven menos influidos por el ambiente. Las isoenzimas fueron descubiertas por Hunter y Markert en 1957 y son diferentes variantes moleculares de una misma enzima presentes en una especie, las cuales desempeñan la misma actividad pero pueden tener diferentes propiedades.

1.3.2.2.1. PROTEÍNAS DE RESERVA.

Las proteínas del endospermo fueron estudiadas ya a comienzos del siglo pasado por Osborne (1907), quién dio las bases para las clasificaciones actuales. La misma se basa en la solubilidad relativa en diferentes solventes: albúminas solubles en agua, globulinas en solución salina, prolaminas en alcohol y glutelinas en ácidos o álcalis.

En la actualidad existen diversos métodos analíticos para el estudio de las proteínas de reserva tales como: centrifugación, cromatografía, análisis de amino ácidos y electroforesis. A su vez, la electroforesis ha sido desarrollada en geles de almidón de una dimensión, en geles de poliacrilamida con o sin dodecil sulfato de sodio (PAGE), punto isoeléctrico (IEF) y poliacrilamida de dos dimensiones. Entre estas formas, la de mayor uso en estudios de diversidad ha sido la electroforesis en poliacrilamida vertical (SDS-PAGE) por presentar una buena resolución de las proteínas.

El uso de proteínas de almacenamiento en sistemática y diversidad genética se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Debido a que las proteínas de reserva carecen de actividad enzimática, ellas son detectadas en el gel por medio de técnicas generales de tinte. Las glutelinas se analizan en geles discontinuos de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, en medio básico (SDS-PAGE) utilizando diferentes tamaños de poros (tamiz molecular). El fraccionamiento de las prolaminas se realiza en electroforesis ácidas (A-PAGE), en geles continuos, utilizando el principio de diferencias en la carga eléctrica. La visualización se realiza en ambos casos mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue R250.

Estudios genéticos han demostrado que los patrones de bandas de las proteínas de reserva son heredados como características discretas y en forma codominante, observándose en algunos casos un efecto maternal (Leonard *et al.*, 1988). El número de genes que controlan estas características es reducido y varía de acuerdo a la especie (Gepts, 1990). Como marcador bioquímico, las proteínas de reserva tienen una baja influencia ambiental, aunque se han reportado algunas excepciones (Gayler y Sykes, 1985) además, permite un análisis rápido de decenas de muestras por ser un método simple y de bajo costo comparado con otras técnicas.

Sin embargo, los distintos patrones electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que puede incluir sustituciones, inserciones y pérdidas nucleotídicas. También las diferencias pueden ser causadas por modificaciones pre y post transcripción y/o traducción. Hasta ahora ha sido difícil relacionar los cambios fenotípicos de los patrones de bandas con el tipo de cambio a nivel molecular. Por otro lado, la cantidad de diversidad genética mediante polimorfismo proteico puede ser subestimada por la no detección de mutaciones silenciosas.

El polimorfismo de las proteínas de reserva en semillas ha sido utilizado para identificar y distinguir genotipos cultivados y silvestres en numerosas especies, tales como: frijoles (*Phaseolus vulgaris*) (Gepts y Bliss, 1986), trigo (*Triticum aestivum*) (Meachman *et al.*, 1978), cebada (*Hordeum vulgare*) (Nebo *et al.*, 1983), arveja (*Pisum sativum*) (Casey *et al.*, 1986) y maíz (*Zea mays*) (Wilson, 1985). En algunas especies, como es el caso del frijol, esta técnica fue tan eficaz que mediante el estudio de un locus fue posible determinar por primera vez la organización de la diversidad genética de la especie (Gepts, 1990), situación que ha sido comprobada más tarde con el uso de isoenzimas y Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP por sus siglas en inglés) (Koenig y Gepts, 1989; Becerra y Gepts, 1994).

1.3.2.2.1.1 Determinación del contenido en proteínas mediante el método de Bradford.

Las proteínas son uno de los componentes más importantes de los seres vivos, y cumplen numerosas funciones: estructurales, enzimáticas, transportadoras y reguladoras. El ensayo de Bradford es un método rápido y sensible para cuantificar proteínas. El método se basa en el cambio de color que experimenta el colorante azul "coomassie" en medio ácido en presencia de proteínas. Las proteínas producen el cambio de la coloración anaranjada del reactivo a una tonalidad azulada, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas. La proteína de la disolución forma con el reactivo un complejo coloreado, cuyo máximo de absorción varía de 495 a 595 nm. La recta de calibrado y la determinación de proteína en la muestra se realizan a la vez. El azul de coomasie reacciona principalmente con residuos de Arg y en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe. Hay varios protocolos según la cantidad estimada de proteína a medir.

1.3.2.2.1.2 Separación electroforética (SDS-PAGE) en gradientes de geles de poliacrilamida.

Como su nombre indica, la electroforesis es el movimiento de iones o moléculas cargadas por acción de un campo eléctrico. Estas técnicas son de las más empleadas en separación e identificación de biomoléculas (especialmente proteínas y ácidos nucleicos). Existen muchas variedades; lo único necesario para llevarlas a cabo es que las moléculas a separar tengan carga, así como disponer del instrumental adecuado para crear un campo eléctrico en el medio donde se encuentran las sustancias a analizar. Parámetros como el pH, que cambia la carga de las moléculas; la masa de las biomoléculas, la naturaleza del soporte electroforético (estructura química, tamaño del poro, etc.) permiten gran versatilidad y, por tanto, aplicación de la técnica a problemas muy diferentes. De esta manera si colocamos un par de electrodos y aplicamos una diferencia de potencial entre ellos, las moléculas con carga negativa (aniones) migrarán hacia el polo positivo (ánodo), y las moléculas con carga positiva (cationes) migrarán hacia el polo negativo (cátodo). Las moléculas sin carga no se verán afectadas. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que desnatura a las proteínas. Al desnaturizarlas se consigue que éstas, sometidas a una corriente eléctrica, migren de acuerdo a su tamaño, ya que el SDS se une creando una densidad de carga que es igual por unidad de superficie independientemente de la proteína en cuestión.

1.3.2.2.2. ISOENZIMAS.

Las isoenzimas se identifican mediante el proceso denominado "electroforesis", que consiste en colocar un extracto proteico del material a analizar en los pocillos de un soporte (papel de celulosa o un gel hecho de agarosa o poliacrilamida) que se somete a un campo eléctrico durante varias horas para que se separen las proteínas de acuerdo con su tamaño o carga eléctrica. Una vez concluida la emigración de las proteínas por medio del frente de corrida denominado Kohlrassusch, el gel es colocado en una solución que contiene los compuestos químicos necesarios (colorantes) para que se lleve a cabo una reacción y se puedan observar posteriormente las isoenzimas en forma de bandas de color en el soporte o gel. Las diferencias en la movilidad electroforética de las isoenzimas son resultantes de las diferencias en las secuencias del ADN que codifican tales enzimas.

Estos marcadores tienen la ventaja de que la técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva debido a que utiliza pequeñas cantidades de material. Además, el control genético de la mayoría de las isoenzimas es bien conocido, por lo que es posible realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles. Por otro lado, las isoenzimas tienen base genética codominante (es decir, que en un individuo diploide es posible visualizar la expresión de ambos alelos); son selectivamente neutrales y están libres de efectos deletéreos (cuando los alelos tienen efectos negativos que imposibilitan la reproducción del

genotipo que los posee), efectos pleiotrópicos (cuando un gen controla la expresión de más de un carácter en un individuo) y/o epistáticos (dominancia de un gen sobre otro).

Desde su descubrimiento, las isoenzimas han jugado un papel importante en muchas áreas de la biología; sin embargo, su utilización ha sido muy limitada debido a ciertas desventajas: 1) presentan problemas técnicos; 2) no permiten cubrir todo el genoma, pues sólo representan una estrecha fracción del contenido genético; 3) únicamente detectan la variación de los genes que codifican para la expresión de una característica del individuo; 4) se dificulta la precisión de los datos obtenidos debido al polimorfismo en el tejido de las isoenzimas (por ejemplo, el polimorfismo detectado en una hoja no es el mismo que el que se obtiene usando la semilla del mismo individuo). También tienen polimorfismo ontogenético, lo cual implica que los resultados obtenidos serán muy diferentes al trabajar con material vegetal proveniente de un árbol joven y de otro adulto; además, las isoenzimas son específicas para determinados sustratos.

Los marcadores bioquímicos (metabolitos secundarios, proteínas estructurales o enzimas y las isoenzimas) se han utilizado extensamente en diversos cultivos como el jitomate (Mendoza-Herrera y Simpson, 1997) y el chile (Prince *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1993; Livingstone *et al.*, 1999).

A pesar de su utilidad, estos marcadores presentan las ventajas de ser afectados de manera intensa por el medio ambiente; son específicos de un tejido en particular o de un estadio de la planta; el número de marcadores morfológicos y bioquímicos es limitado y requieren de un enorme esfuerzo para conjuntar varias características en una sola variedad y su análisis simultáneo (Mendoza-Herrera y Simpson, 1997). Estas limitaciones fueron superadas con la aparición de una nueva generación de marcadores, los llamados "marcadores moleculares" (marcadores basados en la variación del ADN).

1.3.2.3. MARCADORES MOLECULARES.

Los marcadores moleculares revelan polimorfismos de ADN entre individuos genéticamente relacionados. Se considera un marcador genético un *locus* molecular que presenta segregación mendeliana (Lopes *et al.*, 2002). Son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético.

Los marcadores moleculares presentan significativas ventajas en el análisis de la diversidad genética pues no varían con el medio ambiente, pueden detectarse muchos marcadores, se pueden distinguir heterocigotos y homocigotos; además de su utilidad para estimar la cantidad de diversidad genética, está la de determinar su distribución y su interrelación con la geografía u otras variables y la de entender el proceso natural de la evolución, migración y selección (Hodgkin *et al.*, 2001). Además proporciona la oportunidad de verificar la identidad en colecciones de germoplasma.

Los primeros marcadores moleculares usados en estudios del genoma, mapeo y análisis de la diversidad fueron los **RFLP**, que se basan en la técnica de hibridación de tipo Southern, que consiste en la propiedad del ADN de hibridarse o aparearse con secuencias homólogas (Mendoza-Herrera y Simpson, 1997). El ADN se corta con enzimas de restricción y la detección se realiza con Southern blot e hibridación con sondas marcadas. Son reproducibles, co-dominantes y de *locus* específico. No obstante, presenta las desventajas de utilizar elementos radioactivos, implica un procedimiento muy laborioso y requiere gran cantidad de ADN (Saliba-Colombani *et al.*, 2000).

Pero la revolución tecnológica más reciente en la biología molecular fue la introducción en 1985 por Kary Mullis de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, ya conocida como PCR, que es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en pocas horas e *in vitro*, pequeñas cantidades de ADN, utilizando dos oligonucleótidos iniciadores (primers o cebadores) Los cebadores son moléculas de ADN de cadena simple de entre 10 y 40 nucleótidos de longitud que hibridan las cadenas opuestas de la región de interés en el ADN objetivo.

Las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) incluyen:

- RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar)
- AFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados).
- STS (Sitios de secuencia Etiquetada)
- VNTR (Repeticiones de Tandem de Número Variable) que a la vez incluyen:
 - Minisatélites
 - SSR (Secuencias Simples Repetidas) o Microsatélites

1.3.2.3.1. RAPD. Técnica que rebasa los límites de los RFLP. Consiste en la amplificación de ADN genómico usando iniciadores de secuencia arbitraria de 10 pares de bases (pb) y una composición en G+C entre 50 y 80%. Los polimorfismos que detecta son generados por pequeños cambios o por rearrreglos (inserción o eliminación de bases). Permite la estimación de variabilidad genética en poblaciones. No es radiactiva, fácil de manejar, requiere pequeñas cantidades de ADN y puede detectar polimorfismos en secuencias altamente repetidas. Pero presenta las desventajas de ser de naturaleza dominante, en *locus* no específicos y ser de baja reproducibilidad (Saliba-Colombani *et al.*, 2000).

1.3.2.3.2. AFLP. Es una técnica que combina las características de las técnicas RFLP y PCR. El ADN es cortado por dos enzimas de restricción que reconocen distinto número de bases (Eco Ri, seis bases; Miel, cuatro bases). Utilizan como iniciadores dos oligonucleótidos de doble cadena, con longitud de 25 pb y terminaciones diseñadas para alinearse con el ADN cortado por una de las dos enzimas. Detecta mayor número de polimorfismos, es más confiable que la técnica RAPD, permite los análisis simultáneos de un gran número de bandas de ADN por gel.

1.3.2.3.3. STS (Sitios de secuencia Etiquetada). Desarrollada a partir de 1989, aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR. El polimorfismo suele encontrarse fácilmente cuando lo que se amplifican son intrones en lugar de exones. La ventaja principal es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis una vez que las parejas de oligonucleótidos se han establecido claramente. Por tanto se combinan la rapidez de la RAPD con la especificidad de la RFLP. Por la manera en que se determinan los oligonucleótidos y por la forma de analizar los polimorfismos. Son secuencias cortas que identifican secuencias de ADN conocidas, de una o pocas copias. Los STS son importantes para conocer la posición correcta de secuencias parciales con relación a otras, en la secuenciación de genomas (Ej. el humano); son más estables y menos afectados por las condiciones de reacción que los RAPDs y se necesita secuenciar los iniciadores antes de usarlos.

1.3.2.3.4. Minisatélites. Secuencias cortas distribuidas en todo el genoma repetidas en tándem. El ADN se corta con una enzima de restricción que reconoce cuatro bases, posteriormente se hibridiza con sondas de secuencias repetidas. El polimorfismo está dado por el número de repeticiones. Generalmente se utilizan en la identificación de individuos y exclusión de paternidad. Como desventaja presenta ambigüedad alélica.

1.3.2.3.5. Secuencias Simples Repetidas (SSR) o Microsatélites. Están compuestos de dos a cinco nucleótidos de ADN repetidos en tandem en secuencias específicas como son (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n ó (GACA)_n, dispersos a través del genoma eucariótico. Las secuencias de ADN que flanquean a los microsatélites generalmente son conservadas entre individuos de la misma especie, permitiendo la selección de cebadores de PCR que pueden amplificar los SSR que intervienen en todos los genotipos. La variación en el número de repeticiones en tándem (n) resulta en diferentes longitudes de productos del PCR. Estas repeticiones son altamente polimórficas. La simpleza tecnológica, así como por la cantidad y calidad de la información que genera, han convertido el análisis de microsatélites en una de las técnicas más poderosas para la identificación de individuos, los análisis de parentesco y la genética de poblaciones.

Propuestas para el desarrollo de cebadores SSR:

- 1) Cobertura o protección de librerías de ADN genómico por hibridación con oligonucleótidos SSR.
- 2) Investigación de SSRs en base de datos de ADN públicas.
- 3) Usando primers SSR específicos desarrollados en especies relacionadas.

Los pares de cebadores SSR específicos (forward y reverse) son diseñados para amplificación con la PCR basada en las secuencias que flanquean los microsatélites.

Ventajas:

1. Son altamente polimórficos y por tanto, altamente informativos en plantas.

2. Pueden ser analizados por una rápida y técnicamente simple prueba basada en PCR.
3. Son marcadores codominantes (es decir, que en un individuo diploide es posible visualizar la expresión de ambos alelos).
4. Se encuentran distribuidos abundantemente y uniformemente en el genoma vegetal.

Desventajas:

Consumen tiempo y son caros de desarrollar debido a que las regiones genómicas que contienen los SSRs deben ser identificadas y secuenciadas (Molecular Marker Applications to Plant Breeding-96, CIMMYT, Int.).

Los microsatélites de sitios de secuencia etiquetada (STMS) producen acercamientos a marcadores altamente informativos y discriminativos, adecuados para la automatización y los resultados obtenidos pueden ser almacenados fácilmente en una base de datos electrónica, que facilita la comparación de resultados y la colaboración entre laboratorios (Vosman *et al.*, 2001).

A continuación se presentan diferencias entre RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) vs PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

RFLP (Southern)

- * Detecta principalmente polimorfismos en regiones circundantes a la sonda.
- * Detecta polimorfismos en un área más pequeñas.
- * Requiere grandes cantidades de ADN.
- * Involucra consumo en tiempo y pasos.
- * Sistemas de detección que utiliza ya sea radioisótopos o bioquímica,
- *Compleja.

PCR

- * Detecta variación sólo entre fragmentos de ADN amplificados.
- * Detecta variaciones más larga.
- * Requiere de pocos nanogramos de ADN.
- * Fácil y rápida.

La elección del marcador a usar dependerá de los objetivos del estudio, del costo y de las características que cada uno de ellos presentan (Cuadro 1). El cuadro 2, muestra las utilidades de estos mismos.

Cuadro 1. Características generales de los marcadores genéticos.

| Característica | Proteínas | Isoenzima | RFLP | RAPD | VNTR | AFLP | SSR |
|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------|
| Polimorfismo | Alto | Bajo | Bajo-alto | Medio-alto | Medio-alto | Medio-alto | Alto |

| | | | | | | | |
|-----------------------|---------------|---------------|------------|---------------|------------|------------|------------|
| Estabilidad ambiental | Alta | Moderada | Alta | Alta | Alta | Alta | Alta |
| Número de <i>loci</i> | Bajo | Medio | Alto | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Reproducibilidad | Alta | Moderada-alta | Alta | Moderada-alta | Alta | Alta | Alta |
| Aplicación | Rápida-barata | Rápida-barata | Lenta-cara | Rápida-cara | Intermedia | Lenta-cara | Lenta-cara |

RFLP : Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RAPD : Polimorfismo de ADN amplificado al azar

VNTR : Número variable de repeticiones en tándem

AFLP : Polimorfismo de fragmentos amplificados

SSR : Secuencias simples repetidas

Cuadro 2. Utilidad de los principales Marcadores Moleculares.

| | RFLPs | RAPDs | SSRs | AFLPs |
|-----------------------------|-------|-------|------|-------|
| "Fingerprinting" | + | + | + | +++ |
| Diversidad molecular | ++ | + | +++ | + |
| Marcaje de genes | + | ++ | + | ++ |
| Mapeo de QTL | ++ | - | + | ++ |
| SAM | ++ | - | ++ | ++ |

QTL: *Loci* de caracteres cuantitativos

SAM: Selección asistida por marcadores genéticos.

1.4. MARCADORES BÍOQUÍMICOS Y MOLECULARES EMPLEADOS EN PLANTAS.

La clasificación morfológica es a veces ambigua, por lo que se hace necesario contar con otros marcadores como los bioquímicos y moleculares. Estos permiten diferenciar materiales unos de otros para que estos sean incorporados a un banco de germoplasma.

La huella genética de *Ipomoea batata* L. fue estudiada usando 10 iniciadores RAPD (OPA-10, OPB-08, OPB-14, OPB-16, OPB-18, OPB-19, OPH-11, OPW-01, OPW-11, OPW-15) y 5 iniciadores SSR (IB-316, IB-318, IB-242, IB-248, IB-255F) para identificar veintiuno accesiones, seis variedades y cuatro cultivares (McGregor *et al.*, 2001). Como resultado, todos los iniciadores produjeron polimorfismos al menos en algunas de las variedades; pero usando los RAPD OPA-10, OPB-14 y OPW-01, o los 5 iniciadores SSR en combinación, tanto las 21 accesiones, como las 6 variedades pudieron distinguirse; sin embargo, entre los 4 cultivares no se detectaron polimorfismos. Ambas técnicas se consideran útiles para obtener huellas genéticas, pero la de SSR que hace posible la comparación directa entre laboratorios, es más útil.

Con el objetivo de examinar marcadores basados en microsatélites para la discriminación e identificación de 50 variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.), Corbett *et al.* (2001) probaron dos métodos de perfiles de ADN: Microsatélites de sitios de secuencias etiquetadas (STMS) e Inter – SSR PCR. Los resultados mostraron que la amplificación de perfiles de las mismas variedades cambia bajo las diferentes condiciones. Pero los SSR se consideraron como un método no confiable para la identificación de variedades de papa a partir de tubérculos. Los STMS usando cinco pares de iniciadores que fueron muy discriminatorios y cada uno dio un alto valor de diversidad, en combinación incrementaron la capacidad de discriminación de los microsatélites, siendo posible alcanzar 100% de discriminación entre las cincuenta variedades utilizando cualquiera de los pares iniciadores. La mayoría de las variedades fue uniforme para cada microsatélite. En base a lo anterior, los STMS se consideran una alternativa potencialmente más robusta, específica y altamente discriminatoria.

La capacidad de las técnicas RAPD y la ISSR 3' fue comparada, con el objetivo de encontrar huellas genéticas específicas para treinta y siete cultivares de papa, para identificar mezclas, variantes clonales y garantizar su conformidad (Moisan-Thiéry *et al.*, 2001). Utilizando iniciadores RAPD D153 5'GAG-TCA-CGA'G-3'; D116 5'-TAC-GAT-GAC-G-3'; D131 5'GAA-ACA-GCG-T-3'; e iniciadores ISSR P834 de secuencia (AG) YT, con Y=(C,T)² obtenido de Prevost y Wilkinson (1999). Los resultados de este estudio mostraron que los tres iniciadores RAPD dieron bastantes polimorfismos para identificar uno de otro en los treinta y dos cultivares (D116 mostró seis bandas y quince perfiles en treinta y tres cultivares; D131 produjo seis bandas y once perfiles en veintisiete cultivares; D153 produjo doce bandas y cuatro perfiles en treinta y dos cultivares, resultando más informativo). El iniciador ISSR generó perfiles y bandas más complejas y patrones más informativos que los RAPD (trece bandas y veintisiete perfiles en treinta y seis cultivares). Llegando a la conclusión que ambos protocolos pueden ser suficientemente reproducibles para propósitos de huella genética.

En el examen de las interrelaciones entre cuarenta y ocho accesiones de cultivares silvestres y modernos de *Lycopersicon esculentum*, var. *Ceraciforme* y *L. cheesmanii*, así como la diversidad dentro y entre los grupos y para determinar la extensión a la que el germoplasma de cultivares importados se ha introducido con las plantas nativas de Centro y Sudamérica, Williams y St. Clair (1993), utilizaron las técnicas de RFLP y RAPD. En las veinticuatro primeras, veinticuatro clonas se seleccionaron de una biblioteca genómica de tomate (TG53, TG24, TG48, TG31, TG56, TG134, TG22, TG49, TG23, TG69, TG54, TG115, TG20, TG61, TG16, TG72, TG8, TG79, TG103, TG63, TG57, TG46, TG28 y TG68). En la técnica RAPD, se utilizaron cien iniciadores. Ambas técnicas detectaron burdamente frecuencias iguales de *loci* polimórficos entre y dentro de cinco grupos de accesiones de tomate. Adicionalmente, los RAPD pudieron distinguir los cultivares incluidos, por lo que éstos pueden ser útiles en la obtención de la huella de accesiones para aplicaciones de mejoramiento y colecciones de germoplasma.

La eficiencia de los marcadores RFLP, RAPD y AFLP se evaluó, en: 1) la construcción de un mapa de ligamiento genético de dos cruza intraespecíficas de tomate *Lycopersicon esculentum* y *L. esculentum* var. *Ceraciforme*; 2) la localización de cromosomas de genes de función poco conocida; 3) para su polimorfismo, segregación y distribución sobre el genoma; 4) la comparación de este mapa intraespecífico con otros mapas interespecíficos (Saliba-Colombani *et al.*, 2000). Utilizaron quinientas veinticuatro sondas para RFLP, ciento veintitrés iniciadores para RAPD y cuarenta y tres combinaciones de iniciadores Hind III-Msel. La construcción de este mapa incluye un *locus* morfológico, ciento treinta y dos *loci* RFLP, treinta y tres *loci* RAPD y doscientos once *loci* AFLP. Como resultado de este trabajo, se detectó polimorfismos para 8.7% de bandas RFLP (30% de las sondas); 15.8% de RAPD (32% de los iniciadores); y 14.5% de AFLP (100% de la combinación de iniciadores), por lo tanto los RAPD y los AFLP revelaron más polimorfismo que los RFLP. Pero los AFLP, resultan más ventajosos porque permiten el análisis simultáneo de un gran número de bandas de ADN por gel.

Con los objetivos de demostrar que dos taxas distintos representan a los chiles de México (*Capsicum annuum* en el norte y *C. frutescens* en el sur) y de medir la variación genética en un grupo de veinticinco accesiones de chile (*Capsicum sp.*) que han sido previamente examinadas con isozimas, se utilizaron RFLPs. Para ello cuarenta y tres clones de tomate y tres de chile se probaron como sondas de hibridación. Los dendogramas basados en el análisis de agrupamientos de distancias genéticas para los datos de isozimas, datos de RFLP y los datos de RFLP combinados con isozimas, muestran una clara división entre las accesiones del norte y las del sur de México; y todas las accesiones juntas del grupo sur muestran variabilidad en las interrelaciones de las accesiones del norte. Los resultados demostraron que sólo *C. chinense* es la accesión más distante de las otras. En general, la mayoría de las accesiones pudieron ser diferenciada con las diez clones de ADN más polimórficas, lo cual abre la posibilidad de huellas de ADN en chile (Prince *et al.*, 1992).

Técnicas de RFLP y de isozimas fueron utilizadas en la construcción de un mapa molecular de *Capsicum* con ciento noventa y dos marcadores en diecinueve grupos de ligamiento, el mapeo de dos *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) controlando pedicelos múltiples; y la comparación detallada de las relaciones sintéticas de chile y tomate en cuarenta y seis plantas F_2 de una cruce interespecífica F_1 de *C. annuum* cv. NuMex (Prince *et al.*, 1993). En la construcción del mapa, doscientos dieciocho marcadores fueron seleccionados para incluir en el mapa RFLP de chile, de los cuales ciento noventa y dos marcadores mostraron ligamiento en al menos otro marcador y crearon un grupo de ligamiento, cubriendo un total de 720.3 cM. Ciento treinta y cuatro marcadores formaron grupos de ligamiento en un alto nivel de significancia y fueron usados para construir una estructura para el resto. Cincuenta y ocho *loci* adicionales se pusieron exitosamente en la estructura. Los restantes veintiséis no mostraron ligamiento a cualquiera de las otras clones. El tamaño de los grupos de ligamiento alcanzó entre 3.5 – 128.8 cM. Mientras que en el mapeo de genes, el *locus* de carácter cuantitativo (QTL) entre TG195 y TG312, exhibió la acción de un gen recesivo

(alelo de *C. chinense*) sobre el carácter de flores múltiples, pero la acción del *locus* TG191 no pudo ser determinada. En la comparación de la sintenia, un mínimo de 228 cM ($228/720=31\%$) del mapa molecular se estimó conservado con respecto a tomate.

El análisis de ligamiento genético del crecimiento limitado en una progenie de *C. Chinense* x (*C. annuum* x *C. chinense*) fue realizado debido a una interacción núcleo-citoplásmica, utilizando siete iniciadores RAPD para encontrar el marcador ADN de un gen nuclear (5'ATGTGGAAGCTGCCCATGTTC-3') en *C. annuum*, responsable de ese carácter (Inai *et al.*, 1993).

La variación genética interespecífica en el género *Capsicum* de veintiuno accesiones pertenecientes a cinco especies de chile, silvestres y cultivadas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chacoense*, *C. chinense* y *C. frutescens*), e intraespecífica (*C. annuum*) fue examinada mediante las técnicas de RFLP y RAPD (Prince *et al.*, 1995). Para el primer caso, se utilizaron diez clonas de tomate genómico, nueve de tomate epidérmico, y tres de chile genómico, en el análisis RFLP; mientras que en el análisis intraespecífico, se examinaron veintiuno clonas de ADN genómico de chile. En el análisis RAPD, treinta y siete iniciadores decanucléotidos se evaluaron. Como resultado, ambas técnicas mostraron ser útiles en el delineamiento de la diversidad genética intraespecífica (*C. annuum*). Mientras que la huella de los cultivares se puede obtener con el 17% de las clonas usadas individualmente en el análisis de Southern de digestión (Eco-RI) de ADN genómico de plantas completas; así como con el 12.5% de los iniciadores RAPD PCR usados individualmente en PCR.

Se ha construido un mapa integrado de ligamiento molecular en tres poblaciones dobles haploides obtenidas de híbridos F_1 intraespecíficos de chile (*C. annuum* L.), incluyendo principalmente marcadores RFLP y RAPD (Lefebvre *et al.*, 1995). En el procedimiento de RFLP se aprobaron doscientas clonas de DNA con cinco enzimas de digestión. Aproximadamente el 40% de las clonas detectaron RFLP con al menos una enzima en al menos una cruza. Por lo tanto, se probaron sesenta y seis iniciadores al azar, de los cuales, veinticuatro revelaron 1-4 RAPD. Aunque el polimorfismo fue similar en RFLP y RAPD, éstos últimos parecen ser 1.5 más polimórficos que los RFLP. También se observó que un total de veintisiete fragmentos PCR pueden ser usados como marcadores genéticos potenciales en las progenies doble haploides. Los resultados revelan que un mínimo de dieciséis cromosomas dividen los genomas de chile y tomate.

Un mapa molecular del genoma de *Capsicum*, se construyó usando RAPD, isozima, RFLP y AFLP en el mapeo de setenta y cinco plantas de una población F_2 derivada de un híbrido F_1 (*C. annuum* x *C. chinense*). Y se utilizaron fragmentos de chile, tomate y tabaco como sondas en RFLP (Livingstone *et al.*, 1999). El procedimiento de Loaiza-Figueroa *et al.* (1989) se siguió para las isozimas. Ciento dieciséis iniciadores RAPD se probaron, de los cuales cincuenta y nueve produjeron setenta y cinco bandas polimórficas reproducibles. En los AFLP, veinte combinaciones de iniciadores produjeron cuatrocientos sesenta y cinco bandas segregantes. Esto permitió concluir que solamente fueron cuatro regiones en chile y una en tomate donde la homología

fue difícil de asignar o no aparente. La comparación de los mapas de chile y tomate mostró que dieciocho bloques de ligamiento cubren el 98.1% de tomate y 95% del genoma del chile. Así mismo, se definieron con mayor precisión las diferencias entre las estructuras genómicas de *C. annuum* y *C. chinense*, lo cual resulta importante para los mejoradores de plantas, debido a que *C. chinense* representa una significativa fuente de caracteres para el mejoramiento de *C. annuum*.

La identificación de varios marcadores bastante cerrados y útiles como punto de arranque para el desarrollo de marcadores para programas de mejoramiento fue reportada por Blum *et al.* (2002). Con la posibilidad de que existan múltiples fuentes de alelos recesivos C, por lo tanto, la probabilidad de identificar un solo marcador que pueda ser universalmente útil, es pequeña. Para demostrar el potencial de uno de esos marcadores ligados, así como de generar al menos un marcador basado en PCR entre 1cM del *locus* C, para llevar a cabo alta genotipificación temprana en el ciclo celular de plantas; se mapeó una población F₂ de doscientas cuarenta y dos plantas de *C. annuum* x *C. frutescens* BG2816. Para ello se realizó el análisis CAPS, se diseñaron secuencias de iniciadores FIB-F 5'-AGTGAACTAGGGCTGAGATCG-3' y FIB-R 5'-GGACGGTTAAAGTCTCAGCATC-3' usando la secuencia del gen fibrilina de *C. annuum* correspondiente a la clona uno a dos.

Para construir el mapa de ligamiento genético de la región C se usaron marcadores RFLP. Como resultado de este estudio se observó que los marcadores CAPS mostraron completa segregación con uno a dos en la población de mapeo, verificando que ambos marcadores pertenecen al mismo *locus*. El marcador CAPS derivado a partir del gen de la fibrilina por si solo o con marcadores adicionales basados en la PCR convertidos de otro RFLP ligado puede ser aplicado en programas de mejoramiento a gran escala para selección de presencia o ausencia de pungencia en la etapa de plántula (Blum *et al.*, 2002).

Los microsatélites que fueron aislados a partir de dos bibliotecas genómicas y de la base de datos de GenBank, fueron usados para caracterización y mapeo genético molecular de *loci* de microsatélites de *Capsicum* (Lee *et al.*, 2004). Cinco tipos de oligonucleotidos, (AT)₁₅, (GA)₁₅, (GT)₁₅, (ATT)₁₀ y (TTG)₁₀, se usaron como pruebas, clones positivos fueron aislados de bibliotecas genómicas, y secuenciados. Fuera de ciento treinta clones positivos, setenta y siete clones muestran el objeto de los microsatélites, fuera de los cuales cuarenta marcadores confiables de microsatélites fueron desarrollados. Las secuencias de (GA)_n y (GT)_n fueron encontradas más frecuentemente en el genoma de *Capsicum*, seguido por (TTG)_n y (AT)_n. Treinta y seis microsatélites también fueron desarrollados por GenBank y de otros datos publicados. Para medir el contenido de información de estos marcadores, se calculó el CIP. Los marcadores microsatélites del *Capsicum* de las bibliotecas genómicas mostraron un alto nivel del valor del CIP, 0.76, dos veces el valor para los marcadores de datos de GenBank. Cuarenta y seis *loci* de microsatélites fueron puestos en el mapa de ligamiento de SNU-RFLP, que había sido derivado de la cruce interespecífica entre *Capsicum annuum* "TF68" y *Capsicum chinense* "chile habanero". El mapa actual del chile "SNU2" con trescientos treinta y tres marcadores

en quince de ellos los grupos de ligamiento contienen cuarenta y seis SSR y cubren de doscientos ochenta y siete marcadores de RFLP 1,761.5 cM con una distancia media de 5.3 cM entre marcadores.

En el EMBL y las bases de datos de Genbank se buscó la presencia de secuencias que contenían SSR del género de *Capsicum*, se determinó la frecuencia de diversos objetivos perseguidos, y se examinó el polimorfismo de marcadores seleccionados en un panel de genotipos, incluyendo diez genotipos de *Capsicum* spp., uno de tomate y un genotipo de papa (Huang *et al.*, 2000). Los cincuenta y ocho fueron encontrados en secuencias del *Capsicum*. Un subconjunto de doce de éstos se seleccionó para la encuesta sobre el polimorfismo usando las cartillas de PCR que flanqueaban el SSR. Los polimorfismos entre las líneas de *Capsicum* se pueden detectar con cinco de estos pares de cebadores. Los productos de PCR del tamaño predicho también fueron amplificados con tres pares de cebadores en papa y un par de cebador en tomate. El estudio también demostró que microsátélites más cortos podrían ser marcadores valiosos en *Capsicum*.

1.5. MARCADORES BIOQUIMICOS Y MOLECULARES USADOS EN LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL EN PLANTAS CON REFERENCIA ESPECIAL A *Capsicum*.

La caracterización de variedades nigerianas de chile, *Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens* fue investigada usando la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de las proteínas de la semilla (Odeigah *et al.*, 1999). El electrofenograma en gel de SDS-poliacrilamida de las proteínas totales extraídas de la semilla de diez líneas de crianza en cada uno de las seis variedades investigadas reveló un patrón en el cual doce bandas del polipéptido con un rango evidente de peso molecular de veintidós a noventa y ocho kilodaltones. El resultado demostró que las seis variedades se podrían caracterizar en base de presencia/ausencia e intensidades teñidas de siete bandas del polipéptido. Ellos sugieren que la electroforesis en gel del SDS-poliacrilamida de las proteínas de la semilla proporciona una técnica analítica útil para la caracterización de variedades de chile y puede haber duplicados del genotipo en la colección de germoplasma nigeriano del chile.

Las proteínas de la semilla de veintinueve líneas de *Capsicum annuum* L. se analizaron por electroforesis en gel de poliactilamida (Anu y Meter, 2003). El contenido proteínico fue estimado y la técnica de electroforesis en gel de poliactilamida con SDS fue utilizada para estudiar el patrón soluble de la proteína. Cada genotipo era distinto del otro, pero ciertas bandas fueron compartidas por varios genotipos. Los promedios fueron altos (el 80%) entre accesiones PBC 436 de Portugal y de Ornamental Redondo recogidos de la universidad agrícola de Kerala, sugiriendo que el material recogido de la India se habría podido originar en Portugal. Las líneas del chile tenían

generalmente un alto contenido proteínico de la semilla y éstas también se agruparon juntas. La longitud de la fruta, el color de la fruta, y el porcentaje de capsaicina no demostraron correlaciones con los grupos de las accesiones.

Un análisis electroforético de proteínas de reserva de semilla reducida y no reducida de especies *Solanaceae* y *Cucurbitaceae* se realizó por Vladova R. *et al.* (2004). Complejos moleculares altos de uniones de disulfuro entre subunidades intermediarias de globulinas 11S previamente detectadas en cultivares de *Capsicum annuum*, también fueron encontradas en cultivares de *Solanum melongena*.

Un estudio para determinar el potencial de marcadores SSR se realizó en la identificación de variedades de chile (*Capsicum annuum* L.) comparando marcadores SSR y rasgos morfológicos en pruebas de la distinción, de la uniformidad, y de la estabilidad (DUS) (Yong-Sham *et al.*, 2005). Veintisiete de los marcadores SSR eran polimórficos en sesenta y seis variedades del chile, revelando un total de ochenta y nueve alelos. La media del CIP fue de 0.529, extendiéndose de 0.03 a 0.877. El análisis del grupo de patrones de banda separó las variedades en tres grupos correspondientes a tipos varietales. La agrupación basada en rasgos morfológicos característicos demostró un cierto grado de semejanza a las topologías del dendrograma de acuerdo con el índice de SSR. Sin embargo, ninguna correlación significativa fue encontrada entre el SSR y datos morfológicos.

Los cultivares de pimiento mediante el diseño y análisis de marcadores moleculares microsatélite fueron diferenciados por Palop-Esteban *et al.* (2007). Ellos analizaron las relaciones genéticas existentes entre veinticinco cultivares de pimiento (*Capsicum annuum* L.) mediante marcadores microsatélite (SSRs). Desarrollaron diez y ocho *loci* microsatélite a partir de secuencias con microsatélites de pimiento recuperadas de la base de datos GenBank y, la información obtenida de éstos fue combinada con la de otros nueve *loci* publicados por otros autores para evaluar su potencial para la identificación de cultivares. Los veintisiete *loci* microsatélites resultaron polimórficos en los veinticinco cultivares de pimiento analizados, revelando un total de ochenta alelos distintos, con un valor medio de CIP de 0.3. La información genotípica reveló bajos valores de distancia genética (DA) entre los distintos genotipos, indicando la baja diversidad genética existente entre los cultivares. El dendrograma construido diferenció satisfactoriamente veinticuatro cultivares, a excepción de dos cultivares que no pudieron ser distinguidos entre sí. Los coeficientes de correlación entre las matrices de distancia genética, obtenidas de las submuestras de *loci* microsatélite, sugirieron que de ocho a doce *loci* serían suficientes para una correcta caracterización de las cultivares.

Los RAPDs fueron utilizados para la identificación de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en el estado de Morelos, y por sus características agronómicas y culinarias se caracterizaron agronómica, bioquímica y molecularmente (Del Villar-Martínez *et al.*,

2007). Los autores plantearon el establecimiento de la técnica de extracción y purificación del ADN total, así como la obtención de perfiles electroforéticos específicos para la variedad analizada (MorA-92, MorA-98, Kosihikari, y genotipos KxMorA-92 y K₃xmorA98) utilizando la técnica de RAPDs. Ellos realizaron reacciones de amplificación con diferentes oligonuclótidos iniciadores, la secuencia iniciadora formada por 5'-GTTTCGCTCC-3', aportó un perfil electroforético de bandas que van desde 400 hasta 1000pb, y permitió observar diferencias entre Kosihikari y las variedades MorA-92 y 98.

Las variedades para un programa de obtención y control de plantas certificadas de olivo en Andalucía se identificaron por Ojeda *et al.* (2007). Para la autenticidad varietal utilizaron métodos morfológicos y marcadores de ADN. En total analizaron quinientos sesenta y siete árboles candidatos a cabezas de clon, doscientas setenta y dos plantas de material inicial y ciento veinticuatro plantas de material base. La caracterización morfológica de los árboles cabeza de clon fue realizada en base a veintiuno caracteres (diez del fruto y once del endocarpio), según el esquema pomológico de Barranco *et al.* (2005). La identificación molecular fue realizada con ocho marcadores RAPDs seleccionados en estudios previos (Belaj *et al.*, 2002) (OPA-2, OPA-19, OPF-6, OPK-16, OPC-11, OPS-11, OPX-1, OPX-3) y nueve pares de cebadores SSRs, seleccionados y evaluados para la identificación del citado Banco (DCA03, DCA09, DCA16, DCA15, DCA18,, UDO-24, UDO99-19, UDO99-39, UDO99-43). Ellos comprobaron que quinientos veintiséis (93%) eran auténticos y cuarenta y uno (7%) no correspondían con la denominación indicada inicialmente por el viverista.

Las variedades y líneas élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México fueron caracterizadas utilizando marcadores RAPD y SSR (Orona-Castro *et al.*, 2004). Los investigadores colectaron ocho variedades comerciales y siete líneas avanzadas de papa para su caracterización molecular mediante las técnicas de RAPDs y SSRs. En la técnica de RAPD's evaluaron de manera individual dieciséis iniciadores y nueve combinaciones con diferentes proporciones de guanina-citosina (G-C) como nucleótidos selectivos. En la técnica de SSRs evaluaron seis pares de iniciadores, los cuales se seleccionaron con base en el número de genotipos que pueden diferenciar. Las relaciones genéticas entre genotipos fueron calculadas por el método de similitud genética de Nei y Li, usando el paquete de software S-Plus Versión 4.0. La matriz de distancias generada fue utilizada para producir un dendrograma por medio del método UPGMA. En la técnica de RAPDs observaron un total de trescientos noventa y cinco fragmentos, de los cuales el 70.94% fueron polimórficos. En la técnica de SSRs obtuvieron un total de setenta y nueve fragmentos, de los cuales el 88.61% fueron polimórficos. Mediante las dos técnicas diferenciaron los quince genotipos y por medio del análisis de similitud genética de Nei y Li, fueron generados dendrogramas, encontrándose diferencias en la forma de agrupamiento de los diferentes genotipos evaluados.

Los RAPDs se usaron para identificar genotipos de colecciones de germoplasma *Capsicum* y también se usó para estimar relaciones genéticas entre las accesiones

las cuales fueron usadas en el mejoramiento, la productividad y estabilidad de la producción de la cosecha (Adetula, 2006).

Un estudio de variación entre y con especies de *Capsicum* revelado por los marcadores de RAPDs se hicieron por Rodríguez *et al.* (1999). La caracterización se realizó de un total de ciento treinta y cuatro accesiones de seis especies de *Capsicum* usando ciento diez marcadores de RAPDs.

La técnica de RAPDs se usó como herramienta para el estudio de diversidad genética y relación entre veintiocho accesiones de berenjena de cinco especies representativas (Singh *et al.*, 2006). Un total de ciento cuarenta y cuatro productos amplificados polimórficos fueron obtenidos de catorce cebadores, los cuales discriminaron todas las accesiones.

1.7 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

Si existe una amplia variación morfológica entre los cultivares que integran el germoplasma de chile habanero, esta variación pudiera ser de origen genético y puede ser identificada mediante el empleo de marcadores de tipo bioquímico y molecular.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la variabilidad bioquímica y molecular de 5 accesiones de chile habanero preseleccionadas por sus características sobresalientes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✦ Evaluar el polimorfismo bioquímico: la variación en el contenido de las proteínas totales y la composición proteica (técnica SDS-PAGE) de cinco accesiones de chile habanero a partir de muestras de semilla y tejido foliar.

- ✦ Evaluar el polimorfismo molecular: la detección de marcadores microsatélites y RAPDs en diferentes accesiones de chile habanero a partir de ADN de tejido foliar.

- ✦ Analizar de manera integral el polimorfismo detectado a partir de diferentes tipos de marcadores en las 5 accesiones de chile habanero estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Adetula O.A. (2006). Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs. African Journal of Biotechnology. 5 (2): 120-122.

Anu A. and Peter K.V. (2003). Analysis of seed protein of 29 lines of *Capsicum annum* L. by polyacrylamide gel electrophoresis. Genetic Resources and Crop Evolution. 50: 239-243.

Becerra-Velasquez V.L., Gepts P. (1994) RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. Genome 37: 256-263

Blum E., Liu K, Mazourek M., Yoo E.Y., Jahn M. and Paran I. (2002). Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. Genome 45 (4): 702-705.

Casey, R.; Domoney, C. and Ellis, N. (1986). Legume storage proteins and their genes. Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol. 3: 1-95.

Corbett, G. D. Lee, Donini P. and R. J. Cooke. (2001). Identifying of Potato Varieties by DNA Profiling. ISHS: International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars. Acta Horticulturae 546: 387-390.

Del Villar-Martínez Alma, Martínez-Ayala alma L., Ventura-Zapata Elsa, Solano-Navarro Araceli, Corona-Rangel Ma. Luisa, Salcedo Aceves Jorge y Maldonada Amaya Uriel. (2007). Utilización de RAPDs para la identificación de variedades de arroz (*Oryza Sativa* L.). Centro de desarrollo de productos bióticos.

Gayler, K.R. and Sykes, G.E. (1985). Effect of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. Plant Physiol. 78: 582-585.

Gepts, P. (1990). Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In : Brown, H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. and Weir, B.S. (eds.) Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 64-82p.

Gepts, P. and Bliss, F.A. (1986). Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. Econ. Bot. 40: 469-478.

González Estrada T., Gutiérrez Pacheco L. C. y Contreras Martín F. (2006). El chile habanero de Yucatán. Ciencia y Desarrollo. Mayo: 9-15.

Hodgkin, T., R. Roviglioni, M. C. de Vicente and N. Dudnik. (2001). Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources, ISHS International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulturae. Acta Horticulturae 546: 107-118.

Huang S., Zhang B., Milbourne D., Cardle L., Guimei Y and Guo J. (2000). Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica*. 117: 163–167.

Inai, S., Ishikawa K., Nunomura O. and Ikehashi H. (1993). Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87: 416-422.

International Plant Genetic Resources Institute IPGRI (1995). *Descriptores para Capsicum spp.* Roma, Italia. 51.

Koenig R. and Gepts P. (1989). Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris* : further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 78: 809-817.

Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M. and Kim B.D. (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite *loci* in pepper. *Theor Appl Genet* . 108: 619 –627.

Lefebvre V., Palloix A., Caranta C. and Pochard E. (1995). Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome*. 38: 112-121.

Leonard A., Damerval C. and De Vienne D. (1988). Organ-specific variability and inheritance of maize proteins revealed by two dimensional electrophoresis. *Genet. Res.* 52: 97-103.

Livingstone K.D., Lackney V. K., Blauth J.R., Van Wijka R. and Kyle Jahn M. (1999). Genome Mapping in *Capsicum* and the Evolution of Genome Structure in the Solanaceae. *Genetics*. 152: 1183-1202.

Loaiza Figueroa F., Ritland K., Laborde Cancino J.A. and Tanksley S.D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum (Solanaceae)* in Mexico. *Pl. Syst Evol.* 165: 159–188.

Lopes M. S., Sef K. M., Laimer M. and Da Câmara Machado A. (2002). Identification of microsatellite *loci* in apricot. Blackwell Science Ltd, *Molecular Ecology Notes*. 2: 24-26.

McGregor C., Greyling M., Banda J. and Laurie S.. (2001). DNA Fingerprinting of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L): Two Case Studies in Africa. ISHS International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulturae. *Acta Horticulturae* 546: 243-248.

Meachman D.K., Kasarda D.D. and Qualset C.O. (1978). Genetic aspects of wheat gliadin proteins. *Biochem. Genet.* 16: 813-853.

Mendoza-Herrera, A. y Simpson, J. (1997). Uso de marcadores moleculares en la agronomía. *Avances y Perspectivas*. 16: 53-57.

Moisan-Thiéry M., Le Hingrat Y. and Kerlan M. C. (2001). Potato cultivars identification using molecular markers. *ISHS International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulturae*. *Acta Horticulturae* 546: 471-477.

Nebo, E., Beiles A., Storch N., Doll H. and Andersen B. (1983). Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. *Theor. Appl. Genet.* 64: 123-132.

Odeigah P.G.C., Oboh B. and Aghalokpe I.O. (1999). The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 46: 127-131.

Ojeda M. A., Ojeda M. A., Barranco y Trujillo I. D. (2007). Identificación varietal en el programa de obtención y control de plantas certificadas de olivo en Andalucía. Departamento de Agronomía, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba.

Orona-Castro F., Pecina-Quintero V., Rocha-Peña M.A., Parga-Torres V.M., Martínez de La Vega O., Almeyda-León I.H.. (2004). Caracterización de variedades y líneas élite de papa *Solanum tuberosum* L. en México utilizando marcadores RAPD y SSR. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 289 – 300.

Osborne, T. B. (1907). The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Inst. Washington*. Washington D.C. Publ. 84: 1-119.

Palop-Esteban M., González-Gúzman M. y Palomares-Hernández G. (2007). Diseño y análisis de marcadores moleculares para la diferenciación de cultivares de pimiento. *Escuela técnica superior de Ingenieros Agronomos*.

Prevost A. and Wilkinson M.J. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet.* 98: 107-112

Prince J.P., Pochard E. and Tanksley S.D. (1992). Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of pepper. *Genome*. 36: 404-417.

Prince, J. P., E. Pochard, S.D. Tanksley (1993). Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome*. 36: 404-417.

Prince, J. P.; V. K. Lackney; C. Angeles, J. R. Blauth and M.M. Kyle. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*. 38: 224-231.

Rodriguez J. M., Berke T., Engle L. and Nienhuis J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet.* 99: 147-156

Saliba-Colombani V., Causse M., Gervais L. and Philouze J. (2000). Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome.* 43: 29-40.

Singh A. K, Singh Major, Singh A. K., Singh Rakesh, Kumar Sanjeev and Kalloo G. (2006). Genetic diversity within the genus *Solanum* (*Solanaceae*) as revealed by RAPD markers. *Current Science.* 90 (5): 711-716.

Tun-Dzul, José de la Cruz (2001). Chile Habanero. Características y Tecnología de producción. SAGARPA. INIFAP produce. Yucatán. Págs. 74.

Vladova R., Tsanev V. and Petcolicheva K. (2004) Seed storage proteins in *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* species. *Biologia Plantarum.* 48 (4): 601-603.

Vosman, B., Cooke R., Ganai M., Peeters R., Isaac P. and Bredemeijer G. (2001). Standardization and application of microsatellite markers for variety identification in tomato and wheat. ISHS International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulturae. *Acta Horticulturae* 546: 307-316.

Williams, C. E. and St. Clair D. A. (1993). Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome.* 36: 619-629.

Wilson, C.M. 1985. Mapping of zein polypeptides after isoelectric focusing on agarose gels. *Biochem. Genet.* 23: 115-124.

Yong-Sham Kwon, Je-Min Lee, Gi-Bum Yi, Seung-In Yi, Kyung-Min Kim, Eun-Hee Soh, Kyung-Mi Bae, Eun-Kyung Park, In-Ho Song and Byung-Dong Kim. (2005). Use of SSR Markers to Complement Tests of Distinctiveness, Uniformity, and Stability (DUS) of Pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Mol. Cells.* 19 (3): 428-435.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se siguió el procedimiento experimental indicado en la Figura 1.

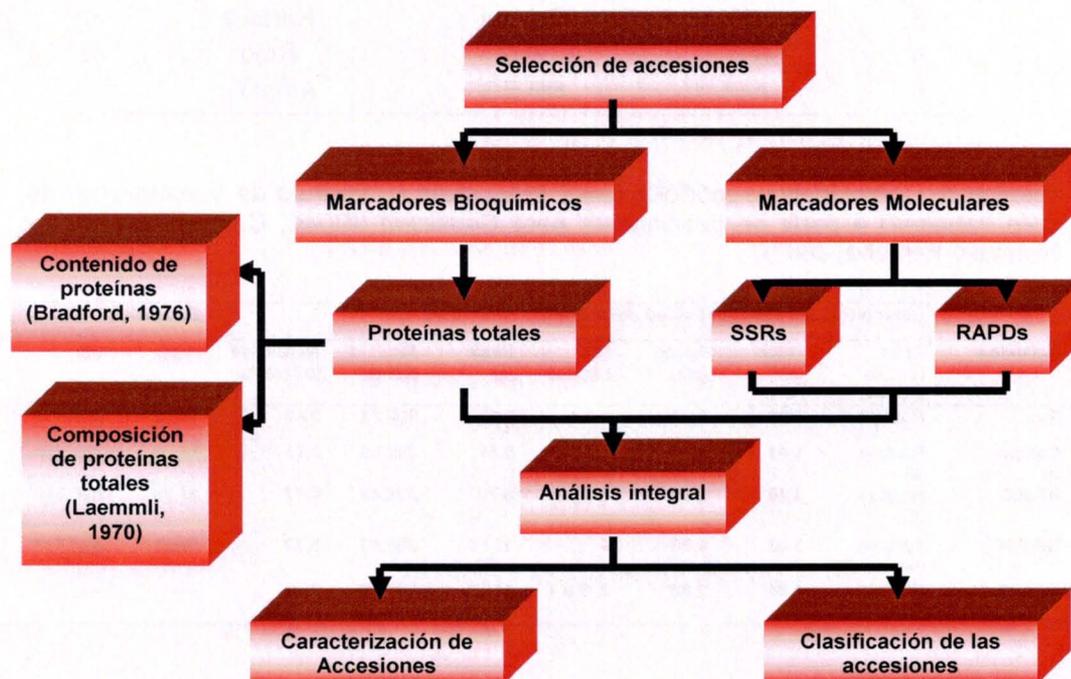


Figura 1. Procedimiento experimental seguido para el estudio bioquímico-molecular de 5 variedades de chile habanero.

2.1. MATERIAL VEGETAL.

La selección de los genotipos (accesiones) de chile habanero se realizó en base a las características sobresalientes (morfológicas y agronómicas) dentro de la colección de chile habanero conservada en el laboratorio de la Dra. Santana.

Como material vegetal para los estudios bioquímicos y moleculares, se utilizaron semillas (sólo en proteínas) y hojas jóvenes de plantas de cada una de las 5 accesiones de chile habanero en estudio, cultivadas bajo condiciones de invernadero (Cuadro 3). Las hojas se liofilizaron en un equipo marca Labconco. Las características

morfológicas y de pungencia de la planta de chile habanero, de las 5 accesiones estudiadas, se presentan en el Cuadro 4. En el Cuadro 5 se presenta las características morfológicas de la semilla.

Cuadro 3. Accesiones de chile habanero en estudio.

| No. | Abreviatura | Accesiones | Color de fruto |
|-----|-------------|--------------------|----------------|
| 1 | N1 | Nux 02 | Naranja |
| 2 | N5 | NP ₄ EC | Naranja |
| 3 | N9 | Campn | Naranja |
| 4 | R17 | Rux | Rojo |
| 5 | A11 | NP ₁ EG | Amarillo |

Cuadro 4. Características morfológicas y productividad del fruto de 5 accesiones de chile habanero a partir de descriptores para *Capsicum* (IPGRI, Canto-Flick, 2007 y Montalvo-Peniche, 2007).

| Accesión | Características y productividad del fruto | | | | | | Pungencia | | |
|--------------------|---|------------|------------|-------------|----------|--------------|-----------------------|-------|---------|
| | Color (Escala IPGRI) | Largo (cm) | Ancho (cm) | No. Lóculos | Peso (g) | No. / planta | Rendimien to / planta | mg/g | uS |
| Rux | Rojo (8) | 4.05 | 3.07 | 3 o 4 | 8.85 | 305.33 | 3.49 | 44.92 | 683,830 |
| Campn | Naranja (6) | 4.48 | 2.80 | 3 o 4 | 8.51 | 292.50 | 3.15 | 49.30 | 739,557 |
| NP ₄ EC | Naranja (6) | 4.40 | 2.95 | 3 o 4 | 8.70 | 522.43 | 4.77 | 41.79 | 626,919 |
| NP ₁ EG | Amarillo naranja (3) | 3.96 | 4.08 | 3 | 17.69 | 296.60 | 5.73 | 59.51 | 892,719 |
| Nux 02 | Naranja (6) | 4.26 | 2.80 | 2, 3 o 4 | 11.90 | 342.00 | 2.24 | ----- | ----- |

Cuadro 5. Características morfológicas de las semillas de 5 accesiones del chile habanero a partir de descriptores para *Capsicum* (IPGRI, Canto-Flick, 2007 y Montalvo-Peniche, 2007).

| Accesión | Color | Superficie | Tamaño | Diámetro (mm) | Peso de 1000 semillas (g) |
|----------|-------|------------|--------|---------------|---------------------------|
| RUx-02 | 1* | 1** | 3**** | 4 | 4.37 |
| Campn-04 | 1* | 1** | 3**** | 3 | 4.54 |
| NP4EC | 1* | 1** | 3**** | 3 | 5.72 |
| NP1EG | 1* | 2*** | 3**** | 3 | 6.25 |
| Nux 02 | 1* | 1** | 3**** | 3 | 4.49 |

*paja, **lisa, ***rugosa, ****pequeña

2.2. METODOLOGÍA.

2.2.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS.

2.2.1.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS.

Para la cuantificación de las proteínas se utilizaron semillas y tejido foliar de 5 accesiones de chile habanero (Cuadro 3). En todos los casos se tomaron 2 muestras réplicas. Para la cuantificación de proteínas de semillas se tomaron semillas individuales de cada accesión previamente embebidas durante 24 h en agua destilada. La determinación del contenido de proteínas en tejido foliar se realizó en base a 25 mg de tejido foliar liofilizado. Las muestras en cada caso se homogenizaron por separado en nitrógeno líquido con 300 μ L de solución tampón de extracción (50ml de solución de Tris 0.011 M ajustada a pH 7.5 con HCl, 1 g de polivinil-pirrolidona-PVP-40, 5.13 g de sacarosa, 250 mg de EDTA, 8.8 mg de albúmina sérica bovina – BSA, 10 mM Cloruro de magnesio, 1 mM Cloruro de calcio). Los extractos se centrifugaron durante 10 min a 13,000 rpm. El sobrenadante extraído fue utilizado para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976) para lo cual se empleó un espectrofotómetro Genesis. Se usó albúmina de suero bovina (BSA) como estándar. En la Figura 2 se muestra la curva de calibración utilizada para la determinación de la concentración de proteínas totales.

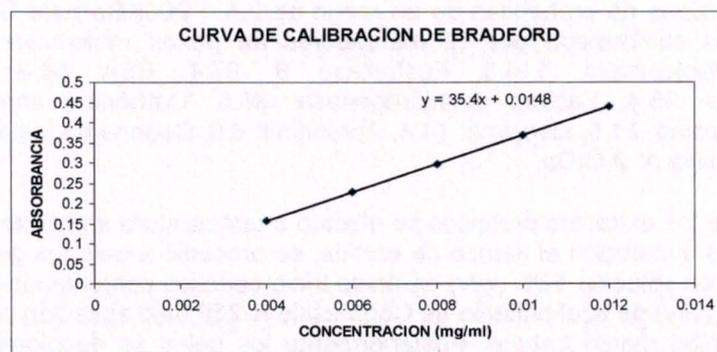


Figura 2. Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovina (BSA) como estándar.

Los datos del contenido de proteínas de la semilla y tejido foliar se procesaron estadísticamente por separado mediante una ANOVA, con un nivel de significancia de 0.05, las medias se contrastaron por el método de Tukey (programa Statistics, versión 6).

2.2.1.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Los estudios de la variación en la composición de proteínas totales se realizaron mediante el método electroforético en sistema discontinuo y disociante de geles de poliacrilamida en lámina vertical (SDS-PAGE; por sus siglas en inglés, electroforesis

en geles de poliacrilamida, empleando dodecil sulfato de sodio) siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). En todos los casos, se emplearon geles de poliacrilamida al 12.5% y 5% (w/v), así como al 15% y 5% para los geles de separación y compactación, respectivamente. Se utilizó una cámara de electroforesis (SE 400 series electrophoresis unit I, Hoefer) de 14 x 16 cm con un espesor de 1.5 mm. En los electrodos se utilizó como tampón Tris ClH-Glicina pH 8.3 de acuerdo con lo propuesto por Laemmli (1970). Previa a la separación se efectuó una premigración durante 30 min a 160 volts utilizándose para ello una fuente de voltaje (marca Consort modelo E844). Las muestras de semilla y tejido foliar de cada accesión en estudio se prepararon por homogenización en nitrógeno líquido de una semilla por cada accesión y 100 mg de tejido liofilizado frío de forma individual y macerado en 300 μ L de solución tampón de extracción para semilla y 500 μ L de solución tampón de extracción (0.011 M Tris pH 7.5 conteniendo 1 g de polivinil-pirrolidona-PVP-40, 5.13 g de sacarosa, 250 mg de EDTA, 8.8 mg de albúmina sérica bobina – BSA, 0.33 ml de 2-mercaptoetanol, 10 mM Cloruro de magnesio, 1 mM Cloruro de calcio) para hoja. Los extractos proteicos se mezclaron con un volumen de tampón muestra y se pasaron por una fase de desnaturalización por calentamiento en baño de María a 100° C. En todos los casos los extractos obtenidos se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf previamente rotulado y se conservó a -20° C hasta su uso. Las muestras (20 μ L) se colocaron de izquierda a derecha y se aplicó el marcador de peso molecular (kit Invitrogene, de 12 bandas de proteínas no preteñidas de un rango de 2.5 – 200KDa para SDS-PAGE). Este kit estuvo conformado por 12 marcadores de pesos moleculares: Miosina: 200kDa, β -galactosidasa: 116.3, Fosforilasa B: 97.4, BSA: 66.3, Glutámico deshidrogenasa: 55.4, Lactato deshidrogenasa: 36.5, Carbónico anhidrasa: 31, inhibidor de Tripsina: 21.5, Lisozima: 14.4, Aprotinina: 6.0, Cadena de Insulina B: 3.5 y Cadena de insulina A: 2.5kDa.

La migración de los extractos proteicos se efectuó a temperatura ambiente a 160 volts durante 3 horas. Finalizado el tiempo de corrida, se procedió a teñir los geles durante toda la noche con solución 12% (w/v) de ácido tricloroacético conteniendo 5% (v/v) de etanol y 0.05% (w/v) de azul brillante de Coomassie R-250 bajo agitación constante en un agitador orbital marca Labnet. Posteriormente los geles se decoloraron en una solución que contenía 40% de etanol y 10% de ácido acético durante un periodo de 24 horas bajo condiciones de agitación constante. El proceso se extendió, cambiando la solución por una nueva varias veces hasta que se pudieron apreciar claramente las bandas de proteínas. El registro de las bandas se efectuó bajo un transiluminador de luz blanca. Para calcular el peso molecular de las proteínas detectadas se utilizó la curva de calibración que se muestra en la Figura 3. Esta se obtuvo de graficar el log 10 de las bandas del marcador contra sus movilidades relativas (R_f) y se tomó la ecuación que más se ajustaba a la recta para calcular los nuevos pesos moleculares de los marcadores y de las bandas obtenidas.

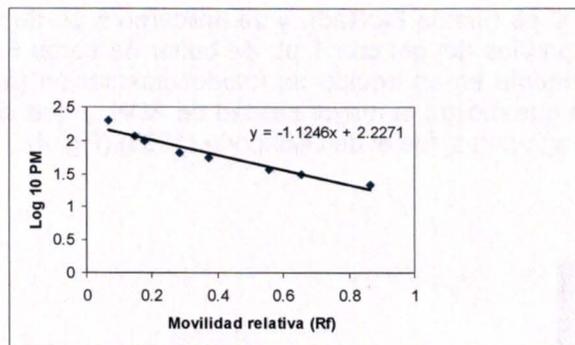


Figura 3. Curva de calibración para calcular el peso molecular (en Daltones) mediante un marcador de peso molecular conocido.

En base al número y movilidad electroforética, se confeccionaron los proteinogramas de los análisis de semillas y hojas correspondientes. El polimorfismo detectado se codificó con valores 0 y 1 (ausencia o presencia de cada banda). La verificación y homologación de las movilidades electroforéticas se determinó a través de comparaciones de los diferentes electromorfos en el mismo gel. Se calculó el número y la distribución de frecuencia de las variantes proteicas polimórficas detectadas así como el nivel de polimorfismo (Pi) en el material evaluado. Los diferentes *loci* genéticos codificando para las diferentes formas proteicas detectadas fueron designados de acuerdo con su movilidad relativa. De este modo el gen que especifica la forma proteica más anódica se designó como 1, el siguiente más anódico como 2, y así sucesivamente. Los datos fueron luego procesados mediante análisis de conglomerados. Este último se realizó de forma jerárquica, utilizando el coeficiente de Jaccard como índice de similitud y el algoritmo de ligamiento UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Average) (Rohlf, 1998).

2.2.2. ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES (SSR) Y RAPDs EN CHILE HABANERO.

2.2.2.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Para determinar el método de extracción del ADN genómico de las 5 accesiones, más adecuado, se probaron 4 procedimientos miniprep: Doyle y Doyle (1990), Saghai-Marooof *et al.* (1984), Montalvo (2007) y el Dellaporta (1983). Se utilizó en todos los casos 30 mg de tejido foliar liofilizado de cada accesión. El ADN extraído fue resuspendido en 40 μ L de agua destilada ultrapura estéril. Para determinar la concentración y pureza del ADN extraído se realizaron lecturas a 260 y 280nm, en un espectrofotómetro marca Génesis 10uv. El control de calidad del ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución tampón 0.5 TBE, conteniendo 1 μ L de bromuro de etidio. Se utilizó para la separación una cámara de electroforesis submarino marca BioRad. Se empleó una fuente de poder marca Consort modelo E844 para efectuar la separación a 90 volts durante 30 min. Se utilizó un marcador de

peso molecular de 100 pb (marca BioRad) y se aplicaron 5 μ L de ADN extraído por cada método en los pocillos del gel con 1 μ L de buffer de carga 6x. Las bandas se visualizaron posteriormente en un equipo de fotodocumentación (marca BioRad). El método de extracción que mostró la mayor calidad de ADN, y que permitió una mejor amplificación de los fragmentos, fue el de Dellaporta (1983) (Fig. 4).

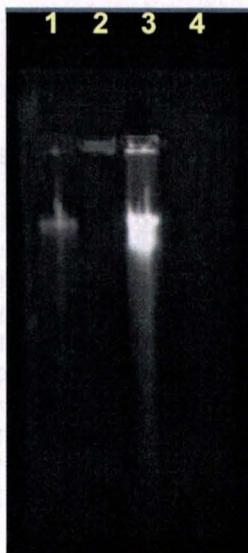


Figura 4. Electroforesis de evaluación de la calidad de ADN en agarosa al 1% con diferentes métodos. Carril: 1, A11 método Dellaporta (1980); 2, A11 método Montalvo (2007); 3, A11 método Doyle y Doyle (1990) y 4 A11 método Saghai-Maroof *et al.* (1984).

2.2.2.2. MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN PARA SSR.

Para el establecimiento de las condiciones mas adecuadas de amplificación de regiones microsatélites de las 5 accesiones de chile habanero en estudio, se siguió el protocolo recomendado por Huang *et al.* (2000). El coctel de reacción se preparó en un volumen final de 22.5 μ L. La mezcla de reacción estuvo constituida por 2.5 μ L de tampón PCR 10x (Mercury), 1.5 μ L de 25 mM $MgCl_2$ (Mercury), 1.5 μ L de 10 mM dNTP's (Mercury), 0.2 μ L de 5 U/ μ L Taq polimerasa (Mercury), 9.8 μ L de H_2O destilada ultrapura estéril, 2 μ L de ADN (dilución), 2.5 μ L de cebador directo (dilución 10:100) y 2.5 μ L de cebador reverso (dilución 10:100). Las características de los iniciadores empleados se indican en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Secuencias de marcadores microsatélites (SSR) de *Capsicum*, marca Invitrogene (Lee *et al.*, 2004).

| <i>Locus</i> | Repetición | Iniciador | Tm INV. | Tamaño (pb) | No. de alelos |
|--------------|--|--|----------|-------------|---------------|
| Hpms 1-173 | (GA) ₁₆ (TG) ₂ | 8 L: TGCTGGGAAAGA TCTCAAAGG R: ATCAAGGAAGCAAACCAATGC | 63 61 | 163 | 6 |
| Hpms 2-13 | (AC) ₁₂ (AT) ₄ | 10 L: TCACCTCATAAGGGCTTATCAATC R: TCCTTAACCTTACGAAACCTTGG | 61 61 | 259 | 8 |
| Hpms 1-1 | (CA) ₁₂ (TA) ₄ | 1 L: TCAACCCAATATTAAGGTCACCTTCC R: CCAGGCGGGGATTGTAGATG | 62 65 | 283 | 10 |
| Hpms 1-168 | (TA) ₁₇ (GA) ₁₂ | 6 L: GCCCCGATCAATGAATTTCAAC R: TGATTTTTGGGTGGAGAGAAAACC | 65 64 | 208 | 9 |
| Hpms CaSIG19 | (CT) ₆ (AT) ₆ (GTAT) ₅ | 9 L: CATGAATTTTCGTCTTGAAGGTCCC R: AAGGGTGTATCGTACGCAGCCTTA | 65 65 | 218 | 7 |
| Hpms 1-172 | /GA) ₁₅ | 7 L: GGGTTTGCATGATCTAAGCATT R: CGCTGGAATGCATTGTCAAAGA | 63 66 | 344 | 9 |
| Hpms 1-143 | (AG) ₁₂ | 4 L: AATGCTGAGCTGGCAAGGAAAG R: TGAAGGCAGTAGGTGGGGAGTG | 65 66 | 221 | 7 |
| Hpms 2-21 | (AT) ₁₁ (AC) ₉ (ATAC) ₁₀ | 11 L: TTTTCAATTGATGCATGACCGATA R: CATGTCATTTTGCATTGATTGG | 64 61 | 295 | 7 |
| Hpms 1-6 | (AT) ₂ (GT) ₄ (AT) ₈ (GT) ₁₃ | 2 L: TCCATAACTTCACCCATGAGTATGA R: GCAACACCCACATTCCCTTCTC | 62 65 | 197 | 11 |

Las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo en un termociclador My cycler BIORAD. Se determinaron las condiciones específicas para la amplificación de las muestras de chile habanero de acuerdo con las características de los cebadores referidos en el Cuadro 6. Con este fin la PCR fue llevada a cabo mediante un programa "touchdown" (Don *et al.*, 1991).

Las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 22 µL probándose con los siguientes programas:

PROGRAMA CON EL CEBADOR 2, 4, 6 Y 9:

95 °C 5'
94 °C 30''
63 °C ↓ 0.1 °C 30'' } 35 CICLOS
72 °C 2'
72 °C 20'
4 °C ∞

PROGRAMA CON EL CEBADOR 8:

95 °C 4'
94 °C 30''
62 °C 30'' } 25 CICLOS
72 °C 10'
72 °C 7'
4 °C ∞

PROGRAMA CON EL CEBADOR 1, 5, 8 Y 10:

95 °C 5'
94 °C 30''
63 °C ↓ 0.2 °C 30'' } 35 CICLOS
72 °C 2'
72 °C 20'
4 °C ∞

PROGRAMA CON EL CEBADOR 2, 4, 7, 10 Y 11:

95 °C 5'
94 °C 30''
61 °C ↓ 0.1 °C 30'' } 40 CICLOS
72 °C 2'
72 °C 20'
4 °C ∞

PROGRAMA CON EL CEBADOR 2, 4 Y 6:

| | | | | |
|-------|---------|------|---|-----------|
| | 95 °C | 5' | | |
| | 94 °C | 30'' | } | 40 CICLOS |
| 69 °C | ↓0.1 °C | 30'' | | |
| | 72 °C | 2' | | |
| | 72 °C | 20' | | |
| | 4 °C | ∞ | | |

PROGRAMA CON EL CEBADOR 3, 10 Y 11:

| | | | | |
|-------|-------|------|---|-----------|
| | 94 °C | 2' | | |
| | 94 °C | 45'' | } | 9 CICLOS |
| 63 °C | ↓1 °C | 1'' | | |
| | 72 °C | 1' | | |
| | 94 °C | 45'' | } | 36 CICLOS |
| 60 °C | 45'' | | | |
| | 72 °C | 1' | | |
| | 72 °C | 4' | | |
| | 4 °C | ∞ | | |

Los que mejores resultados dieron fueron los siguientes:

- Para el cebador 8 se empleó un programa consistente en: un paso de desnaturalización inicial de 95 ° C durante 4 min. seguido por un protocolo compuesto por 25 ciclos, cada uno de los cuales incluyó una desnaturalización a 94 ° C por 30 s; una hibridación a 62 ° C durante 30 s.; y una extensión a 72 ° C durante 10 min. El resto del programa incluyó una extensión a 72 ° C durante 7 min.
- Para los cebadores 6 y 9 se empleó un programa consistente en: un paso de desnaturalización inicial de 95 ° C durante 5 min seguido por un protocolo compuesto por 35 ciclos, cada uno de los cuales incluyó una desnaturalización a 94 ° C por 30 s; una hibridación para el primer ciclo de 63 ° C, decreciendo 0.1 ° C por ciclo, hasta alcanzar 59.5 ° C en el último ciclo, durante 35 s.; y una extensión a 72 ° C durante 2 min. El resto del programa incluyó una extensión a 72 ° C durante 20 min.

- Para los cebadores 4 y 7 se empleó un programa consistente en: un paso de desnaturalización inicial de 95 ° C durante 5 min. seguido por un protocolo compuesto por 40 ciclos, cada uno de los cuales incluyó una desnaturalización a 94 ° C por 30 s; una hibridación para el primer ciclo de 61 ° C, decreciendo 0.1 ° C por ciclo, hasta alcanzar 57 ° C en el último ciclo, durante 40 s.; y una extensión a 72 ° C durante 2 min. El resto del programa incluyó una extensión a 72 ° C durante 20 min.

2.2.2.3. MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN PARA RAPDs.

El cóctel de reacción se preparó en un volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción estuvo constituida por 5 µL de tampón PCR 10x Invitrogen, 1.5 µL de 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.8 µL de 2.5 mM dNTP's (Mercury), 0.5 µL de 5 U/µL Taq polimerasa Invitrogen, 37.2 µL de H₂O destilada ultrapura estéril, 2 µL de ADN (dilución), 3 µL de cebador (dilución 10:100). Las características de los iniciadores empleados se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Secuencias de marcadores RAPDs (OPK), marca Tubek.

| Nombre del cebador | Secuencia de 5' a 3' | Temperatura de alineamiento |
|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| Tubek 01 | CAT TCG AGC C | 32 ° C |
| Tubek 02 | GTC TCC GCA A | 32 ° C |
| Tubek 03 | CCA GCT TAG G | 32 ° C |
| Tubek 04 | CCG CCC AAA C | 34 ° C |
| Tubek 10 | GTG CAA CGT G | 32 ° C |
| Tubek 11 | AAT GCC CCA G | 32 ° C |
| Tubek 12 | TGG CCC TCA C | 34 ° C |
| Tubek 19 | CAC AGG CGG A | 34 ° C |

Las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo, en un termociclador My cycler BIORAD. Se determinaron las condiciones específicas para la amplificación de las muestras de Chile habanero de acuerdo con las características de los cebadores referidos en la Cuadro 7.

Las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL con los siguientes programas:

PROGRAMA CON EL CEBADOR 01, 02, 03, 10 Y 11:

| | | |
|----------|---|-----------|
| 94 °C 3' | } | 45 CICLOS |
| 94 °C 1' | | |
| 32 °C 1' | | |
| 72 °C 2' | | |
| 72 °C 7' | | |
| 4 °C ∞ | | |

PROGRAMA CON EL CEBADOR 04, 12 Y 19:

| | | |
|----------|---|-----------|
| 94 °C 1' | } | 45 CICLOS |
| 94 °C 1' | | |
| 34 °C 1' | | |
| 72 °C 2' | | |
| 72 °C 7' | | |
| 4 °C ∞ | | |

2.2.2.4. DETECCIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

La separación de los productos amplificados, tanto para RAPDs como para SSR, se llevó a cabo mediante procedimientos electroforéticos primeramente en geles de agarosa al 3%, utilizando TBE (Trisma base, Ác. Bórico y EDTA 5M pH8) 1x como solución tampón de corrida y 1 µL de una solución de 10 mg/ml de bromuro de etidio. Se aplicaron 8 µL de producto amplificado y 2 µL de buffer de carga 6x en cada pocillo. Se empleó 2 µL de marcador de peso molecular (marca Biorad) de 100 pb y 1 Kb para SSR y RAPDS, respectivamente. Las corridas se desarrollan a 80 volts durante 90 min en una cámara de electroforesis submarina (marca BIO-RAD). Los geles se fotodocumentaron en el Gel Doc (marca BIO-RAD). Posteriormente los productos amplificados que mejores resultados mostraron en geles de agarosa, para el caso de los SSR, fueron separados en gel no desnaturizante de poliacrilamida al 8% y solución tampón 1x TBE. Para ello se utilizó una cámara de electroforesis vertical marca Hoefer, SE 400 de 14 x 16 cm con un espesor de 1.5 mm. Se aplicó un volumen de 8 µL de muestra amplificada y 2 µL de solución tampón de carga 6x. Se aplicó asimismo 2 µL del marcador de peso molecular de 100pb marca BioRad, utilizando el protocolo de Ácidos Nucleicos en PAGE tiñéndose con plata. Finalmente los geles se documentaron en un equipo Kodak Lab-Tech.

Los geles se evaluaron y las bandas se codificaron con los valores de 0-1 correspondiente a los estados de ausencia/presencia, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos fueron calculados mediante una aproximación exponencial a partir

de los datos de marcadores de peso molecular. La distancia entre bandas fue establecida por medición directa, a partir de las líneas medias de las mismas

2.2.3. ANÁLISIS DE DATOS.

Se realizó el porcentaje de polimorfismo total de 5 cebadores específicos de *Capsicum*. Un *locus* se considera polimórfico si podemos detectar más de un alelo en las accesiones. Generalmente el criterio más utilizado es el del 1%, es decir, un *locus* será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99% en las accesiones. A las 5 accesiones evaluadas se les hizo un análisis de perfiles alélicos. Para ello, fue registrado el número de alelos detectados en el gel, con su respectivo tamaño (pb) para cada una de las accesiones.

Se determinó el valor del **contenido de información polimórfica (CIP)**. Existen varias ecuaciones matemáticas, sin embargo, su valor oscila siempre entre 0 y 1. Los valores del contenido de información polimórfica fueron determinados mediante el algoritmo (Working group on Biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular, 1997; Smith *et al.*, 1997; Ben Hui Liu, 1987):

$$1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde p_i es la frecuencia alélica del i -ésimo alelo y n el número de alelos observados.

Para estimar las distancias génicas entre individuos se utilizaron, mediante el programa Statistic (versión 2.01), coeficientes de similitud basados en la presencia o ausencia de alelos (Ludbrook and Dudley, 1998). La matriz de distancia genética fue calculada mediante el índice de similitud de Manhattan y se construyó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA.

Con la finalidad de estimar la utilidad de los sistemas de marcadores en *Capsicum chinense*, fueron calculados algunos de los parámetros propuestos por Orón-Castro *et al.* (2004), como son el índice de diversidad mediante la ecuación: $ID = 1 - p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo i , donde cada alelo individual es considerado *locus* único y a su vez un fragmento de amplificación. La proporción múltiple efectiva (EMR), que es definida como el producto de la fracción de *loci* polimórficos multiplicada por el número total de *loci* polimórficos para un análisis por oligonucleótidos RAPD's y SSR's. El índice de marcador (IM), cuya estimación es usada para evaluar la utilidad total de cada sistema de marcadores, se define como el producto de los promedios del índice de diversidad para los fragmentos polimórficos y el EMR para cada análisis.

BIBLIOGRAFÍA

Barranco D., Trujillo I., Rallo L. (2005). In: Variedades de olivo en España. Libro I. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Elaiografía Hispánica. 45-229.

Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I. (2002). Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor. Appl. Genet.* 105: 638-644.

Ben Hui Liu. (1987). *Statistical Genomics. Linkage, mapping and QTL analysis.* CRC PRESS . 612.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Canto-Flick Adriana. (2007). Caracterización morfológica y determinación de los niveles de capsaicina en 18 accesiones de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán. 90.

Dellaporta S.L., Wood J. and Hicks J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 11724. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1 (4): 19-21.

Don R. H., Cox P. T., Wainwright B. J., Baker K., and Mattick J. S. (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 4008.

Doyle, J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–14.

Huang S., Zhang B., Milbourne D., Cardle L., Guimei Y. and Guo. J. (2000). Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica.* 117: 163–167.

Jaccard, P. (1908): "Nouvelles recherches sur la distribution florale". *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223- 270.

Laemmli Uk.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685.

Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M. and Kim B.D. (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite *loci* in pepper. *Theor Appl Genet.* 108: 619 –627.

Ludbrook J. and Dudley H. (1998). Why permutation tests are superior to t and F tests in biomedical research. *American Statistician*. 52: 127–132.

Mantel N. A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.

Montalvo Peniche María del Carmen (2007). Conservación *in vitro* y caracterización molecular del germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en la península de Yucatán. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán. 96.

Orona-Castro F., Pecina-Quintero V., Rocha-Peña M.A., Parga-Torres V.M., Martínez de La Vega O., Almeyda-León I.H.. (2004). Caracterización de variedades y líneas élite de papa *Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 289 – 300.

Rohlf, M. (1998) NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02i. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.

Saghai-Marooif M.A., Soliman K., Jorgensen R.A y Allard R.W.. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. 81: 8014-8018.

Smith J. S. C., Chin E. C. L., Shu H., Smith O. S. and Wall S. J., (1997) An evaluation of the utility of SSR *loci* as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163–173.

Working group on biochemical and molecular techniques and DNA–profiling in particular. (1997) E Dirlewanger - 4 thsession, Cambridge, UK.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES.

3.1.1. SEMILLAS.

Los resultados obtenidos no mostraron la existencia de diferencias significativas en el contenido de proteínas totales de semillas de las cinco accesiones en estudio (Fig. 5).

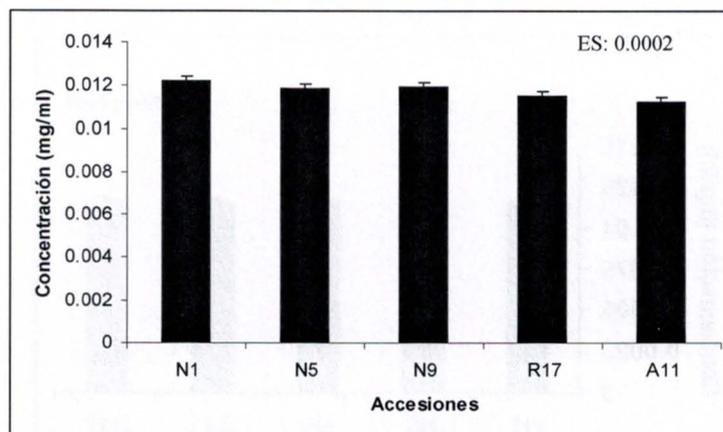


Figura 5. Variación en el contenido de proteínas totales de semillas en 5 accesiones de chile habanero. ES: error estándar, ns: no significativo, $p < 0.05$.

Los resultados del análisis descriptivo revelaron valores de amplitud de variación que oscilaron entre de 0.0109 a 0.0125mg/ml con un error estándar de 0.0002 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Estadísticas descriptivas del contenido de proteínas totales en semillas en 5 accesiones de chile habanero.

| Concentración Proteínas totales | Media (mg/ml) | Amplitud de variación (mg/ml) | | Desviación estándar | Error estándar |
|---------------------------------|---------------|-------------------------------|--------|---------------------|----------------|
| | | Mínimo | Máximo | | |
| | 0.0117 | 0.0109 | 0.0125 | 0.0005 | 0.0002 |

Estos resultados concuerdan en general con lo obtenido por Jasso *et al.* (2002) quienes detectaron similitudes en el contenido de proteínas totales en semillas de variedades de girasol. Estos autores encontraron valores que oscilaron entre 25 a 90 mg/g. En el material evaluado de chile habanero sin embargo se observó un rango de variación más estrecho que osciló entre 87-99 mg/g. Estos resultados denotan la similitud genética existente para este carácter entre las accesiones en estudio por lo que no resultó adecuado para su uso en la identificación varietal.

3.1.2. HOJAS.

Los resultados del análisis del contenido de proteínas en tejido foliar mostraron similar comportamiento a lo detectado en semillas dado que no se apreciaron diferencias significativas, entre las accesiones en estudio (Fig. 6).

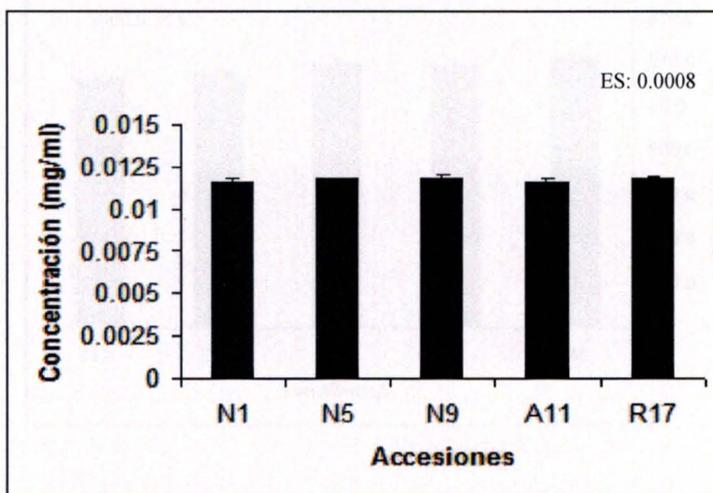


Figura 6. Variación en el contenido de proteínas totales de hoja en 5 accesiones de chile habanero, ES: error estándar, ns: no significativo, $p < 0.05$.

Los resultados del análisis descriptivo del contenido de proteínas en hoja revelaron valores de amplitud de variación entre 0.0112 a 0.0124 mg/ml y un valor de error estándar de 0.0008 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Estadísticas descriptivas de la variación en el contenido de proteínas totales en hojas de chile habanero.

| Concentración Proteínas totales | Media (mg/ml) | Amplitud de variación (mg/ml) | | Desviación estándar | Error estándar |
|---------------------------------------|------------------|----------------------------------|--------|------------------------|-------------------|
| | | Mínimo | Máximo | | |
| | 0.0117 | 0.0112 | 0.0124 | 0.0003 | 0.0008 |

Estos resultados se encuentran dentro del rango de contenido de proteínas detectada en tejido foliar de girasol (25 a 200mg/g) por Jasso *et al.*, (2002) ya que en las accesiones de *Capsicum chinense* evaluadas se observaron valores que variaron entre 45 – 50 mg/g. Los menores valores detectados en nuestro estudio pudieran atribuirse no solo a las diferencias inherentes a nivel de especie sino que estos autores evaluaron la cinética del contenido de proteínas en tejido foliar desde fase de plántula hasta su maduración. De cualquier forma las similitudes genéticas detectadas entre las accesiones evaluadas para este carácter no lo hacen adecuado para su uso como marcador para la identificación varietal.

3.2. VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

3.2.1. SEMILLAS.

Los resultados del análisis de los perfiles de bandas de proteínas totales en semillas revelaron la presencia de diecinueve bandas de las cuales doce fueron polimórficas (Fig.7). Estas bandas se distribuyeron en tres regiones Pt1, Pt2 y Pt3. La región Pt1 (III, medianamente teñida) presentó cuatro bandas monomórficas mientras que la región Pt2 (II, muy teñida) mostró tres bandas monomórficas y tres polimórficas. Por último la región Pt3 (I, tenuemente teñida) se caracterizó por la presencia de nueve bandas polimórficas.

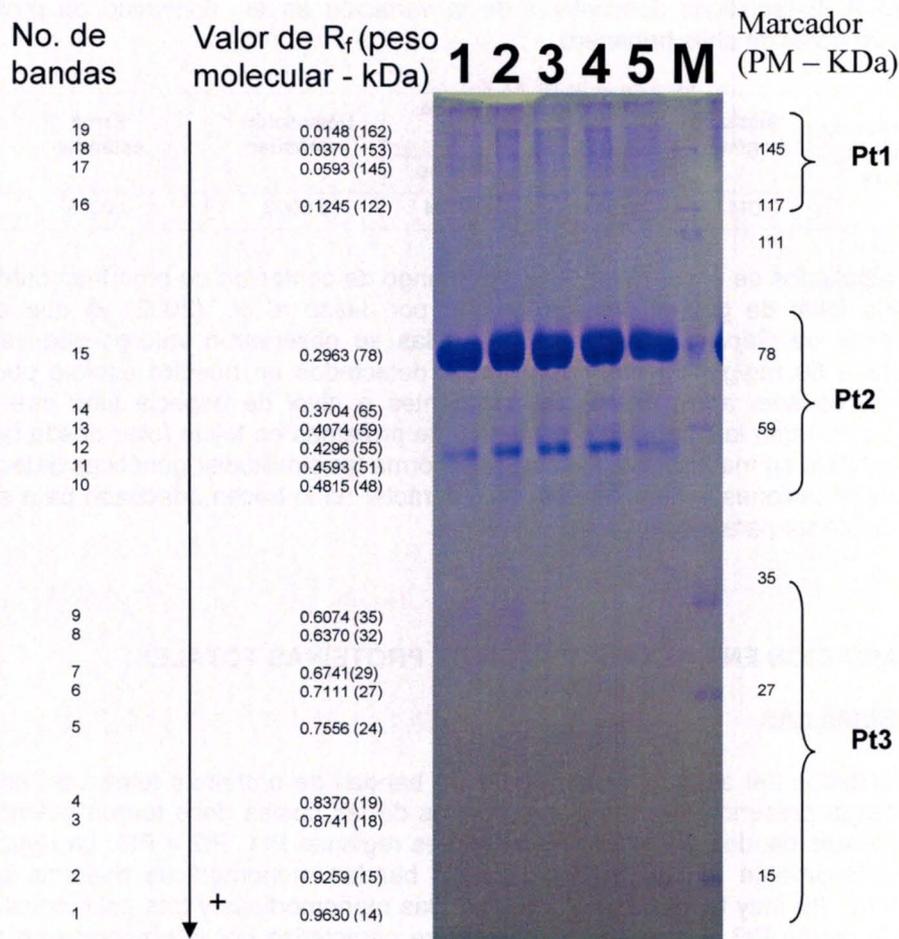


Figura 7. Perfiles de bandas de proteínas totales en semillas de 5 accesiones de *Capsicum chinense* (SDS-PAGE: 12.5%-5% gel de separación/compactación). Carril: 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, marcador. Pt1, Pt2 y Pt3: regiones de movilidad electroforética.

En la región Pt3 (I) se detectó la presencia de un mayor número de bandas polimórficas pero mostró una baja resolución dado que las bandas aparecieron tenuemente teñidas; por ello resultó más conveniente centrar el análisis del polimorfismo entre las accesiones en la región Pt2 que presentó no sólo mayor polimorfismo sino también una mayor resolución electroforética en éste estudio. La banda trece, con un peso molecular de 59 kDa, permitió identificar las accesiones N5, N9 y R17 del resto; la banda once, con peso molecular de 51 kDa, estuvo presente en las accesiones N1 y N5; mientras que la banda diez, con peso molecular de 48 kDa, resultó característica de las accesiones N1, N5, N9 y R17.

Estos resultados indican la presencia de un polimorfismo de proteínas totales (63.15%) entre las accesiones de chile habanero evaluadas que en su conjunto permitió distinguir la mayoría de las accesiones en estudio.

Estos resultados concuerdan con lo encontrado en diversas especies de *Capsicum*. Así en un estudio electroforético realizado por Odeigah *et al.* (1999) en cuatro variedades de *Capsicum annuum* y dos variedades de *Capsicum frutescens* se detectaron 12 bandas, con un rango de peso molecular de 22 a 98 kilodaltones, que permitieron identificar completamente las variedades en estudio. Las dos variedades de *Capsicum frutescens* se distinguieron de *Capsicum annuum* por tres bandas de 35, 60 y 69 kDa. Se ha indicado que existen complejos de uniones de puentes de disulfuro en unidades intermediarias de globulinas 11S (unión ácida de 40 kDa y unión básica de 20 kDa de polipéptido respectivamente) en cultivares de *Capsicum annuum* y en *Solanum melongena* (Vladova *et al.*, 2004). Al respecto se ha indicado que las bandas de 48 y 19 kDa detectadas en *Capsicum chinense* están presentes solamente en ciertas accesiones. Es muy probable que dichas bandas constituyan unidades intermediarias de globulinas 11S, de gran valor para la identificación varietal.

Por otro lado, Karihaloo, *et al.*, (2002) reportó la presencia de treinta y cinco bandas polipeptídicas en un rango de 14.5 kDa a 52.5 kDa, en setenta y dos accesiones de *Solanum melongena* L. En todas ellas se observó cierto polimorfismo entre las accesiones. En *Capsicum chinense* el rango de peso molecular varió entre 14 a 162 kDa lo que sugiere que aunque ambas pertenecen a la misma familia existe una diferenciación entre ellas, lo que se manifiesta en la presencia de bandas particulares a la especie.

El proteínograma obtenido empleando una concentración del 15% y 5% (separación/compactación) mostró la presencia de diez bandas de las cuales ninguna resultó polimórfica (Fig. 8).

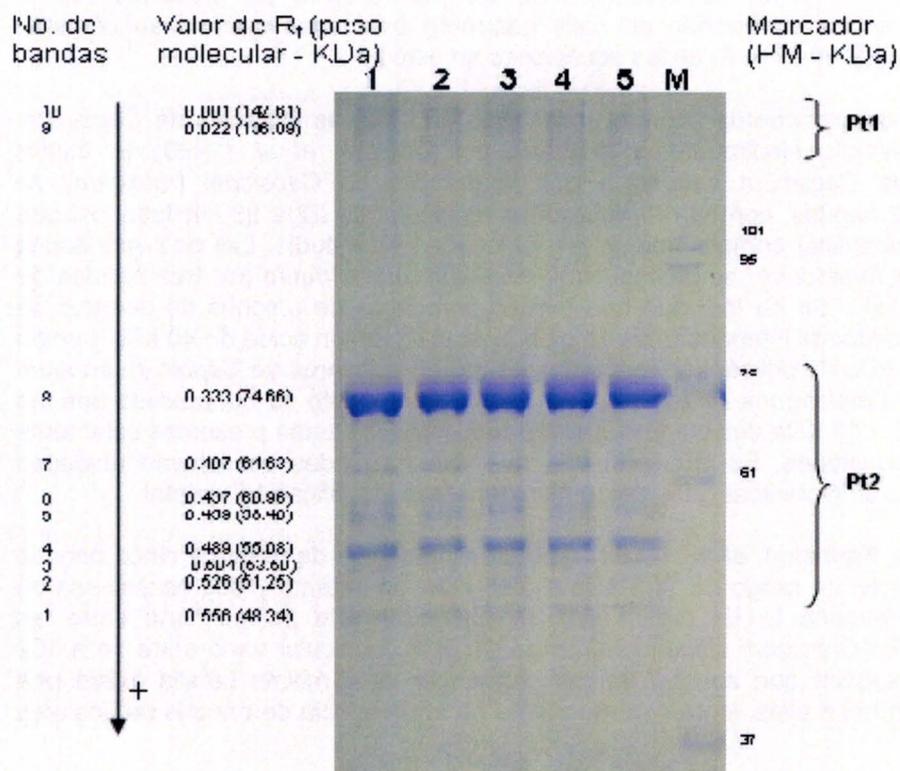


Figura 8. Perfiles de bandas de proteínas totales en semillas de 5 accesiones de *Capsicum chinense* (SDS-PAGE: 15% -5% gel de separación-compactación). Carril 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, marcador. Pt1 y Pt2: regiones de movilidad electroforética.

De acuerdo con estos resultados las 8 bandas en estudio se distribuyeron en dos regiones de migración electroforéticas Pt1 y Pt2. En la región se observa que la banda número ocho del grupo Pt2, es la que se expresa más en el gel con un valor de R_f de 0.333 y un peso molecular de 74.66 kDa. El grupo Pt1 contienen dos bandas muy tenuemente teñidas con valores de R_f de 0.001 y 0.022 y pesos moleculares de 142.61 kDa y 136.89 kDa. El grupo Pt2 contiene seis bandas medianamente teñidas y dos muy teñidas con de valores de R_f que van de 0.333 a 0.556 y pesos moleculares de 74.66 kDa a 48.34 kDa, respectivamente.

3.2.2. HOJAS.

El perfil de bandas de proteínas totales detectado en hojas de las cinco accesiones de chile habanero reveló la presencia de un total de treinta y dos bandas, de las cuales quince fueron polimórficas (Fig. 9). Estas bandas se distribuyeron en tres regiones. La región Pt1 (poco teñida) presentó tres bandas monomórficas y seis polimórficas; la

región Pt2 (muy teñida) mostró cinco bandas monomórficas y una polimórfica; mientras que la región Pt3 (medianamente teñida) presentó nueve bandas monomórficas y ocho polimórficas. En esta última se observó un mayor polimorfismo. En general considerando de conjunto el nivel de polimorfismo detectado fue de 46.88 %.

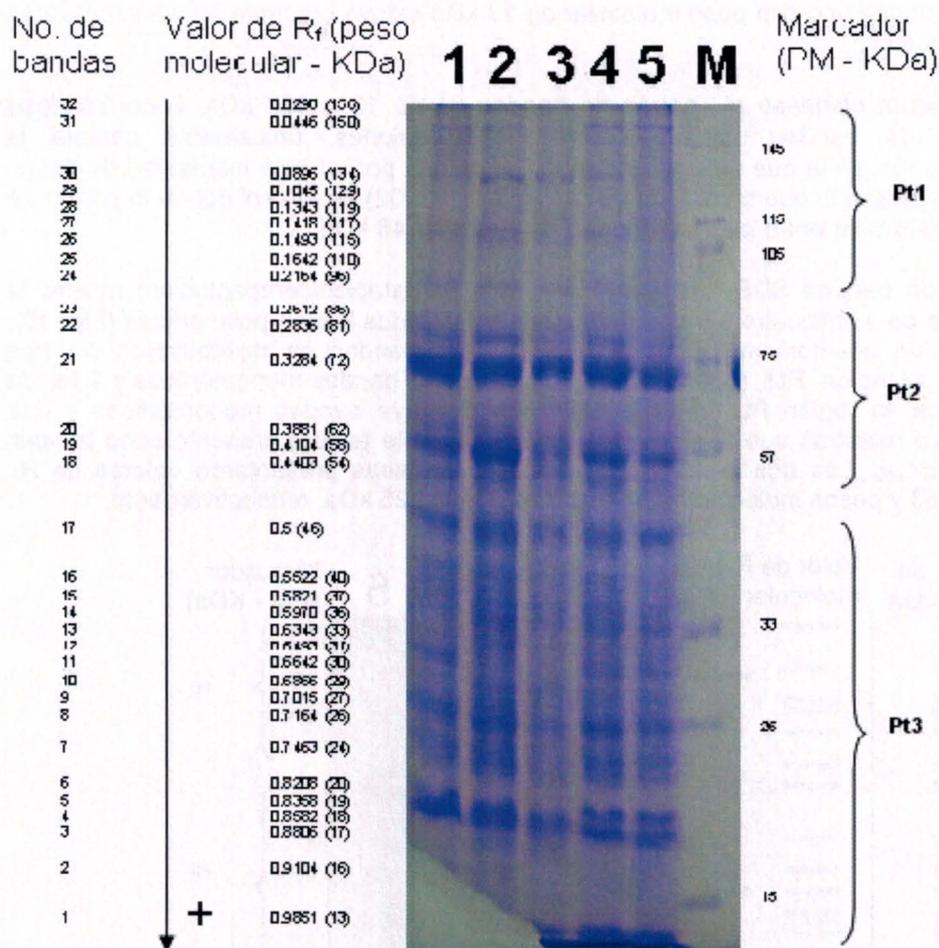


Figura 9. Perfiles de bandas de proteínas totales en hojas de 5 accesiones de *Capsicum chinense* (SDS-PAGE: 12.5% -5% gel de separación-compactación). Carril 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, Marcador. Pt1, Pt2 y Pt3: regiones de movilidad electroforética.

En la región Pt3 la banda once con un peso molecular de 30 kDa identificó a las accesiones N5, R17 y A11, la banda diez con peso molecular de 29 kDa estuvo

presente en las accesiones N5, N9, R17 y A11; por otro lado, la banda nueve con peso molecular de 27 kDa identificó a la accesión N5, la banda siete con peso molecular de 24 kDa estuvo presente en las accesiones N1, N5, R17 y A11, la banda seis con peso molecular de 20 kDa resultó distintiva de las accesiones N1, N5, R17 y A11, la banda tres con peso molecular de 17 kDa, estuvo presente en las accesiones N5 y N9, la banda dos con peso molecular de 16 kDa identificó a las accesiones N5 y R17 y la banda uno con peso molecular de 13 kDa estuvo presente en las accesiones N9, R17 y A11.

En *Capsicum chinense* el patrón de bandeado va de 13 a 156 kDa, encontrándose patrones de bandeado similares entre las accesiones, únicamente cambia la concentración en la que se encuentran las proteínas por su baja intensidad de éstas. Esto es similar a lo que se reporta por Jasso *et al* (2002) en girasol donde el patrón de bandeado es similar entre las variedades y va de 28 a 148 kDa.

El perfil de bandas SDS-PAGE al 15% y 5% (separación/compactación) mostró la presencia de veinticuatro bandas de las cuales solo dos fueron polimórficas (Fig. 10); teniendo un polimorfismo total de 8.69 %. Las bandas se distribuyeron en tres regiones: la región Pt1, (poco teñida) presentó cinco bandas monomórficas y 1 banda polimórfica, la región Pt2 (muy teñida) mostró nueve bandas monomórficas y una polimórfica mientras que la región Pt3 (medianamente teñida) presentó ocho bandas monomórficas. Las dos bandas polimórficas detectadas presentaron valores de R_f : 0.13 y 0.53 y pesos moleculares de 111.77 kDa y 51.25 kDa, respectivamente.

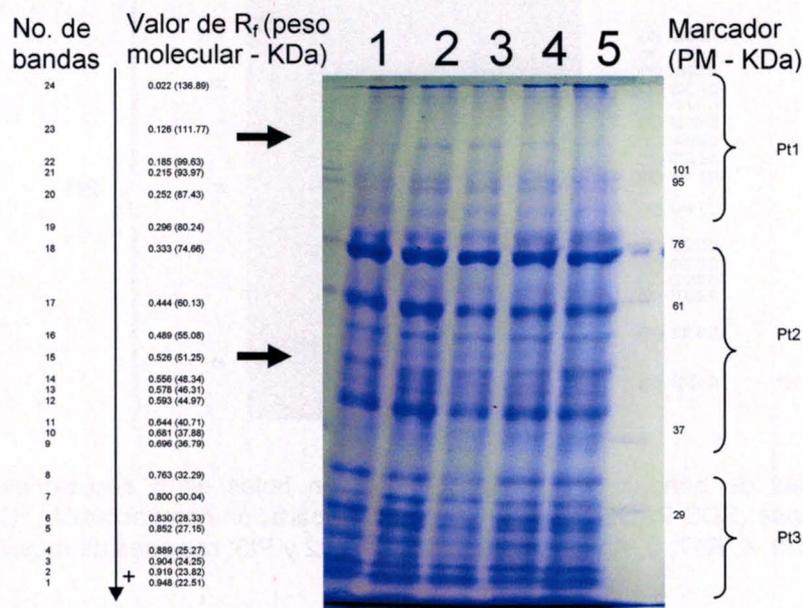


Figura 10. Perfiles de bandas de proteínas totales en hojas de 5 accesiones de *Capsicum chinense* (SDS-PAGE: 15% -5% gel de separación-compactación). Carril 1,

N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; M, Marcador. Pt1, Pt2 y Pt3: regiones de movilidad electroforética.

3.3. VARIACIÓN MOLECULAR.

3.3.1. SSR.

El análisis molecular de 5 accesiones de chile habanero, utilizando 5 pares de cebadores seleccionados (Figuras 11, 12, 13, 14 y 15), permitió detectar un total de 27 alelos, obteniéndose polimorfismo solamente a partir de los cebadores 6 y 9 de 20% y 18.2%, respectivamente.

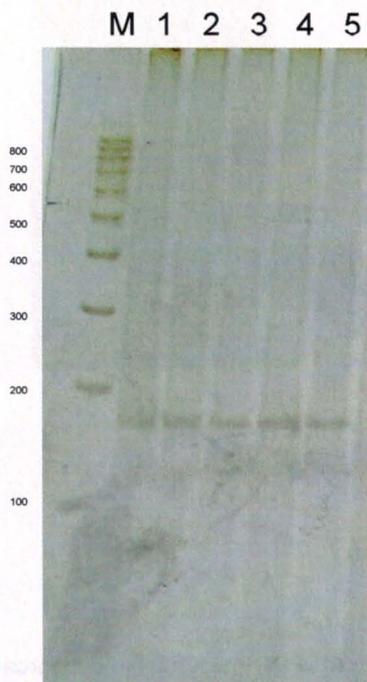


Figura 11. Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 8). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11.

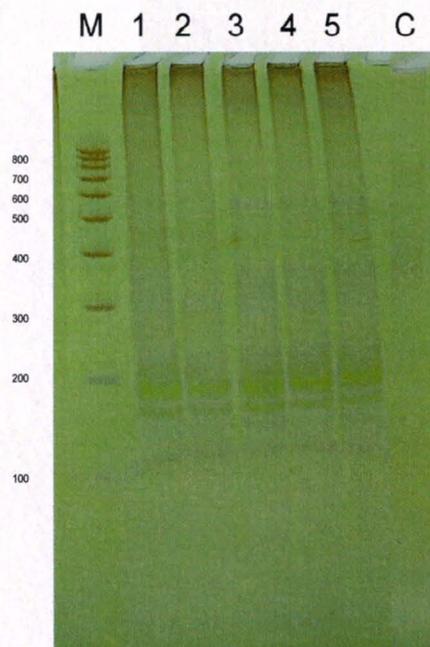


Figura 12. Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 6). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; C, control.

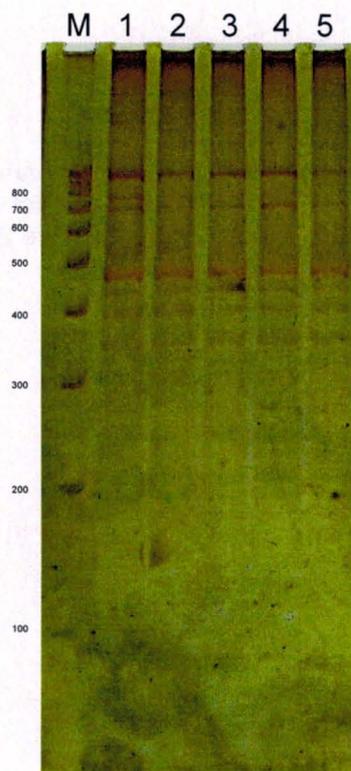


Figura 13. Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 9). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11.

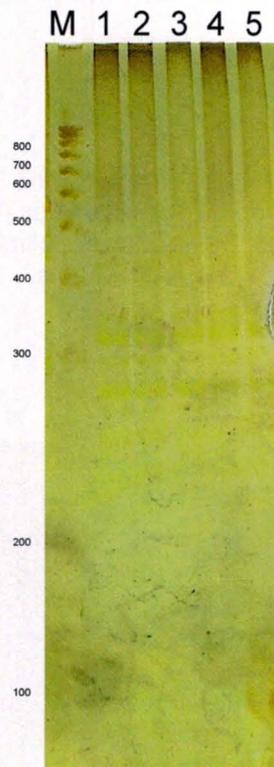


Figura 14. Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 4). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11.

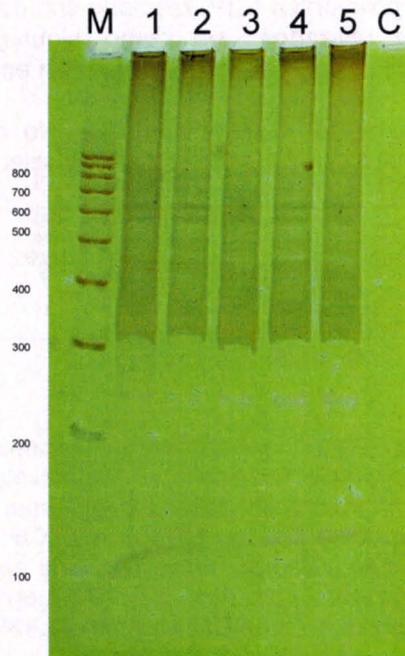


Figura 15. Polimorfismo de marcadores SSR (cebador 7). Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 8%. Carril: M, marcador; 1, N1; 2, N5; 3, N9; 4, R17; 5, A11; C, control.

En el Cuadro 10 se puede observar que, en base al análisis de perfiles alélicos de las cinco accesiones evaluadas, todas pudieron ser distinguidas con los cinco pares de *loci* microsatélites utilizados. Se aprecia que el alelo de tamaño de 790 pb no se encuentra en la accesión A11 y está presente en las restantes cuatro accesiones, el alelo de tamaño de 560 pb está presente en las accesiones N9 y A11 y el alelo de tamaño de 520 pb se encuentra es las accesiones N1 y N5.

Cuadro 10. Perfil de alelos obtenidos del análisis molecular en 5 accesiones de chile habanero utilizando 5 pares de microsatélites.

| Accesión | No. de alelos | Tamaño (pb) |
|----------|---------------|--|
| N1 | 26 | 990, 900, 790, 720, 700, 630, 590, 520, 500, 470, 450, 440, 400, 380, 350, 310, 280, 260, 250, 240, 210, 200, 190, 180, 160, 140 |
| N5 | 26 | 990, 900, 790, 720, 700, 630, 590, 520, 500, 470, 450, 440, 400, 380, 350, 310, 280, 260, 250, 240, 210, 200, 190, 180, 160, 140 |
| N9 | 26 | 990, 900, 790, 720, 700, 630, 590, 560, 500, 470, 450, 440, 400, 380, 350, 310, 280, 260, 250, 240, 210, 200, 190, 180, 160, 140 |
| R17 | 25 | 990, 900, 790, 720, 700, 630, 590, 500, 470, 450, 440, 400, 380, 350, 310, 280, 260, 250, 240, 210, 200, 190, 180, 160, 140 |
| A11 | 25 | 990, 900, 720, 700, 630, 590, 560, 500, 470, 450, 440, 400, 380, 350, 310, 280, 260, 250, 240, 210, 200, 190, 180, 160, 140 |

El contenido de información polimórfica (CIP) revelado con dos pares de marcadores microsatélites de *Capsicum* utilizados, así como algunas de sus principales características y número de alelos detectados, se presentan en la Cuadro 11.

Cuadro 11. Contenido de información polimórfica (CIP) y No. de alelos detectados en las accesiones de chile habanero con 2 *loci* microsatélites seleccionados.

| No. | Locus | Repetición | Secuencia | No. de alelos | Rango (pb) | CIP |
|-----|---------------|---|--|---------------|------------|------|
| 6 | Hpms 1-168* | (TA) ₁₇ (GA) ₁₂ | L: GCCCCGATCAATGAATTTCAAC R: TGATTTTTGGGTGGAGAGAAAACC | 5 | 560 - 160 | 0.84 |
| 9 | Hpms CaSIG19* | (CT) ₈ (AT) ₈ (GTAT) ₅ | L: CATGAATTTCTGCTTGAAGGTCCC R: AAGGGTGTATCGTACGCAGCCTTA | 11 | 990 - 190 | 0.83 |

* Microsatélites de *Capsicum* (Lee, 2004).

Yong-Sham y colaboradores (2005) reportaron, de treientos dieciséis pares de cebadores SSR que evaluaron, sólo veintisiete (8.5%) revelaron polimorfismo para sesenta y seis variedades examinadas de *Capsicum annum* L; el número de alelos por *locus* varió en un rango de dos a siete y obtuvieron un CIP promedio de 0.529. En el caso de *Capsicum chinense* se utilizaron nueve pares de cebadores para examinar cinco accesiones, de los cebadores solo dos (22.22%) fueron polimórficos, con un rango de cinco a once alelos por *locus* y un CIP promedio 0.835.

Por otra parte, veintisiete *loci* de microsatélites (amplificados consistentemente y fácilmente codificables) resultaron polimórficos para veinticinco cultivares de *C. annum*, los cuales fueron utilizados por Palop *et al.* (2007). La mayoría de los marcadores presentaron un número reducido de alelos y genotipos, lo que se tradujo en unos valores bajos de CIP, con un valor medio de 0.3; caso contrario a *C. chinense* que tiene un CIP alto.

En otro reporte se encontró que seis pares de iniciadores produjeron en total setenta y nueve productos diferentes (13.17 bandas en promedio por *locus*), 70 (88.61%) de ellos fueron polimórficos para ocho variedades comerciales y siete líneas avanzadas de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Orona *et al.*, 2004). El tamaño de los fragmentos observados estuvo en el ámbito de 150 a 850 pb; mientras que para *C. chinense* fue en un de 160 – 990 pb.

3.3.2. RAPDs.

A partir del análisis de cinco accesiones de chile habanero, utilizando cinco pares de cebadores preseleccionados (Figuras 16, 17, 18, 19 y 20), se pudo detectar un total de 47 alelos. El polimorfismo detectado por los cebadores 3, 4, 11, 12 y 19 fueron de 87.5%, 60%, 44.44%, 61.53% y 58.33%, respectivamente.

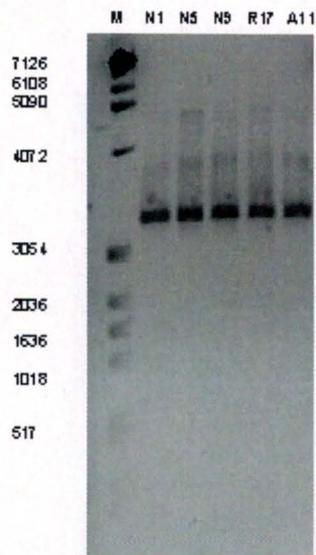


Figura 16. Polimorfismo de marcadores RAPD (cebedor turbek 3) en geles de agarosa al 3%.

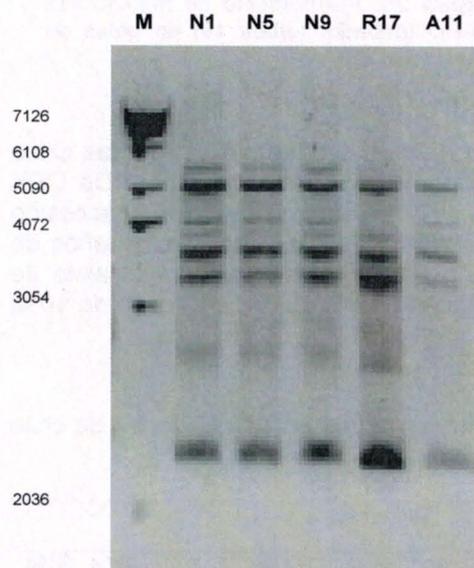


Figura 17. Polimorfismo de marcadores RAPD (cebedor turbek 4) en geles de agarosa al 3%.

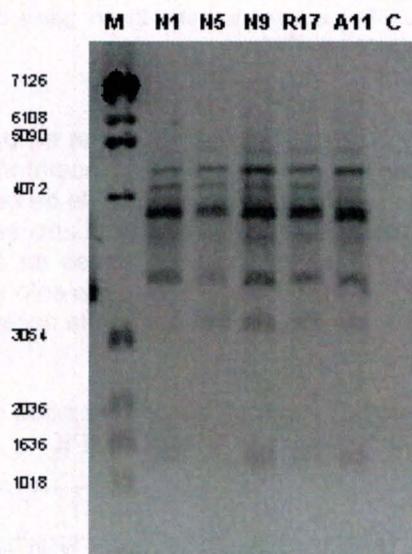


Figura 18. Polimorfismo de marcadores RAPD (cebedor turbek 11) en geles de agarosa al 3%.

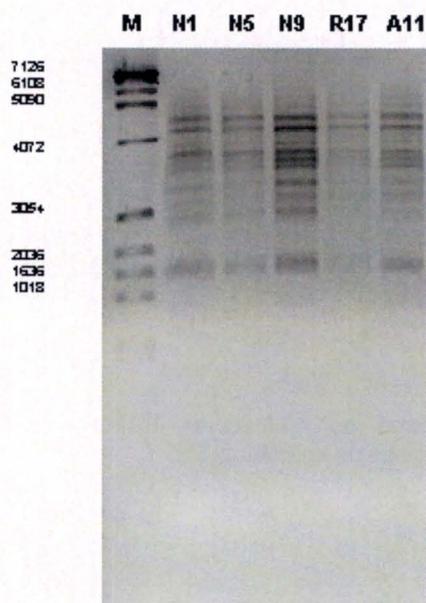


Figura 19. Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 12) en geles de agarosa al 3%.

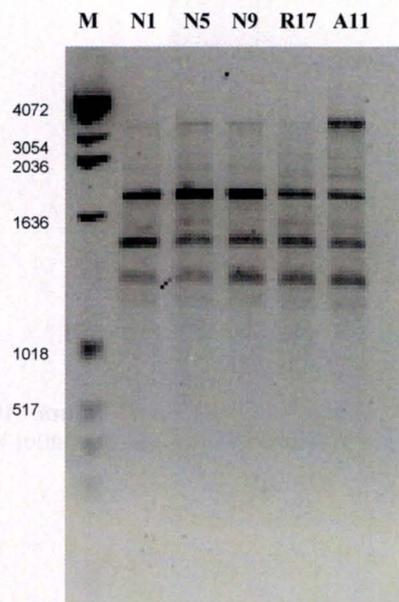


Figura 20. Polimorfismo de marcadores RAPD (cebador turbek 19) en geles de agarosa al 3%.

En el Cuadro 12 se observó que en base al análisis de perfiles alélicos de las cinco accesiones evaluadas, todas pudieron ser distinguidas con los cinco RAPDs OPK utilizados. Se aprecia que el alelo de tamaño de 4172 pb está presente en la accesión N5 y no se encuentra en las cuatro accesiones restantes, los alelos de tamaños de 3450 y 2700 pb están presentes en la accesión R17 y en el resto no, el alelo de tamaño de 1550 pb se encuentra sólo en la accesión N1 y el alelo de tamaño de 1018 pb se encuentra únicamente en la accesión N9.

Cuadro 12. Perfil de alelos obtenidos del análisis molecular en 5 accesiones de Chile habanero utilizando 5 RAPDs OPK.

| Accesión | No. de alelos | Tamaño (pb) |
|----------|---------------|--|
| N1 | 30 | 5900, 5590, 5090, 4972, 4900, 4572, 4372, 4272, 4072, 3954, 3854, 3800, 3754, 3654, 3600, 3454, 3400, 3254, 2836, 2800, 2300, 1936, 1700, 1690, 1636, 1550, 1518, 1500, 1418, 1350 |
| N5 | 33 | 5900, 5590, 5090, 4972, 4900, 4872, 4572, 4372, 4272, 4172, 4072, 3954, 3854, 3800, 3754, 3654, 3600, 3554, 3454, 3254, 3154, 2836, 2800, 2300, 2036, 1936, 1700, 1690, 1636, 1590, 1500, 1418, 1350 |
| N9 | 35 | 6108, 5900, 5590, 5090, 4972, 4900, 4872, 4572, 4372, 4272, 4072, 3954, 3854, 3800, 3754, 3654, 3600, 3554, 3454, 3400, 3254, 3154, |

| | | |
|-----|----|--|
| | | 2900, 2836, 2800, 2300, 1936, 1700, 1690, 1636, 1518, 1500, 1418, 1350, 1018 |
| R17 | 30 | 5090, 4972, 4900, 4872, 4572, 4372, 4272, 3954, 3854, 3800, 3754, 3600, 3574, 3554, 3454, 3450, 3400, 3154, 2900, 2700, 2300, 2036, 1836 1700, 1690, 1636, 1590, 1500, 1418, 1350 |
| A11 | 34 | 6108, 5590, 5090, 4972, 4900, 4872, 4572, 4372, 4272, 4072, 3954, 3854, 3754, 3654, 3600, 3574, 3554, 3454, 3400, 3254, 3154, 2836, 2800, 2300, 2036, 1836, 1700, 1690, 1636, 1590, 1518, 1500, 1418, 1350 |

El contenido de información polimórfica (CIP) revelado con cinco marcadores RAPDs OPK (marca Tubek) utilizados, así como algunas de sus principales características y número de alelos detectados, se presentan en la Cuadro 13.

Cuadro 13. Contenido de información polimórfica (CIP) y No. de alelos detectados en las accesiones de chile habanero con 5 RAPDs seleccionados.

| Nombre del cebador | Secuencia de 5' a 3' | No. de alelos | Rango (pb) | CIP |
|--------------------|----------------------|---------------|-------------|------|
| Tubek 03* | CCA GCT TAG G | 8 | 5972 - 3454 | 0.30 |
| Tubek 04* | CCG CCC AAA C | 10 | 5900 - 2300 | 0.45 |
| Tubek 11* | AAT GCC CCA G | 9 | 5090 - 1518 | 0.48 |
| Tubek 12* | TGG CCC TCA C | 13 | 6108- 1018 | 0.46 |
| Tubek 19* | CAC AGG CGG A | 12 | 3554 - 1350 | 0.71 |

* RAPD OPK

En cinco especies de *Solanum* (Sinah *et al.* 2006) se reportó ciento cuarenta y cuatro productos polimórficos de catorce cebadores, el número de productos amplificados se encontró en un rango de ocho a trece, el promedio fue de 10.28 bandas, el porcentaje de polimorfismo observado fue de 0.05 – 0.82 y el rango de alelos fue de 0.15 a 3.50 kb. Por otra parte, en quince genotipos de papa se diferenciaron y observó un total de trescientos noventa y cinco productos (en promedio 14.42 bandas por cebador), de los cuales doscientos noventa y seis (70.94%) fueron polimórficos (Orona *et al.*, 2004) y el rango de los alelos fue de 0.20 a 4.00 kb.

Adetula (2006) reportó, en especies de *Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens*, un total de sesenta y siete bandas polimórficas fueron obtenidas de nueve cebadores, el número de productos amplificados se encontró en un rango de siete a catorce, el promedio fue de once bandas y el porcentaje de polimorfismo observado fue de 0.50 – 0.77.

En el caso de la especie *C. chinense* se obtuvo un total de cuarenta y siete productos (en promedio 10.4 bandas por cebador) de los cuales treinta (63.38%) fueron polimórficos, en un rango de ocho a trece bandas, estos valores son similares a los

reportados en las cinco especies de *Solanum*. El porcentaje de polimorfismo fue de 0.30 – 0.71, esto concuerda con el rango reportado por Adetula para *Capsicum annum* y *Capsicum frutescens*. El rango de alelos fue de 1.52 a 6.11 kb un poco por encima del reportado por Sinah *et al.* (2006) y Orona *et al.* (2004).

3.3.3 COMPARACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS MARCADORES.

De acuerdo a los parámetros reportados por Powell *et al.* (1996) se estimó la utilidad de cada sistema de marcadores, como el índice de diversidad (ID), la proporción múltiple efectiva (EMR) y el índice del marcador (IM). Los altos o bajos niveles de polimorfismo determinan el nivel ID genética presente en un grupo de individuos. En este caso se observó un nivel de diversidad en los genotipos evaluados tanto para RAPDs como para SSRs (92 y 84 % respectivamente). En el Cuadro 14 también se muestran las medias aritméticas para la EMR de cada sistema de marcadores. El promedio de EMR en RAPDs fue de cinco, mientras que para los SSRs fue de dos, lo cual fue debido a que este sistema de marcador sólo revela un *locus*. En cuanto al índice de marcador fue de 4.6 y 1.68 para RAPDs y SSRs, respectivamente (Cuadro 14).

Cuadro 14. Parámetros que permiten estimar la utilidad de cada sistema de marcadores.

| Metodología | Total de análisis | No. de productos | Total de productos polimórficos | % de Prod. polimórficos | Media ID | EMR | IM |
|-------------|-------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------|----------|-----|------|
| SSR | 2 | 15 | 3 | 20.00 | 0.84 | 2 | 1.68 |
| RAPDs | 5 | 47 | 30 | 63.38 | 0.92 | 5 | 4.6 |

3.4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.

3.4.1 CLASIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR POR ANÁLISIS DE CONGLOMERADO.

En base a las variantes bioquímicas detectadas, en la electroforesis SDS-PAGE de semilla de *Capsicum chinense* (12.5%- 5%, separación/compactación), se clasificaron las accesiones en dos grupos (Figura 21). El grupo I corresponde a las accesiones de fruto de color naranja (Nux 02, NP₄EC, Campn) y rojo (Rux 02). El grupo II incluye únicamente la accesión amarilla (NP₁EG).

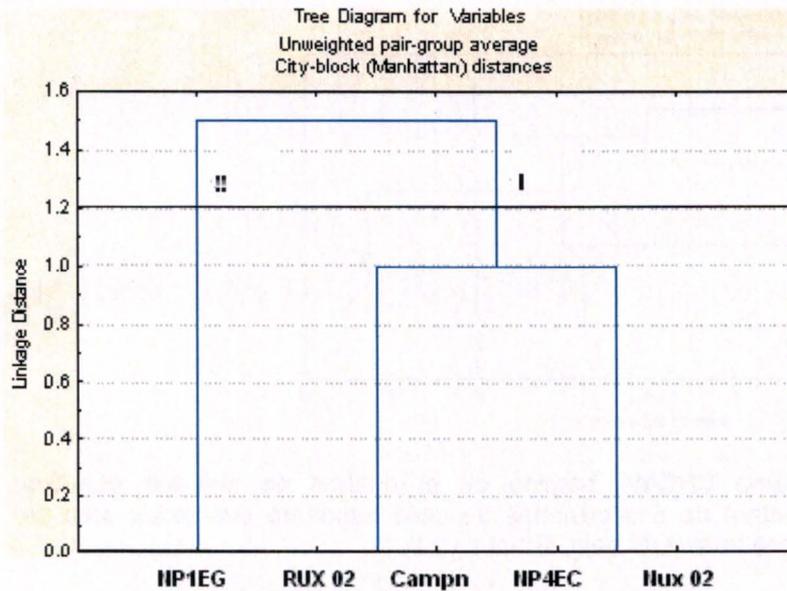


Figura 21. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas para su composición de proteínas totales de semilla. Grupos I y II.

En base a las variantes bioquímicas detectadas, en la electroforesis SDS-PAGE de hojas de *Capsicum chinense* (12.5%- 5%, S-C), se clasificaron las accesiones en dos grupos (Figura 22). El grupo I corresponde a las accesiones de fruto de color naranja (Nux 02, NP₄EC), rojo (Rux 02), y amarillo (NP₁EG). El grupo II incluye únicamente la accesión Campn de color naranja.

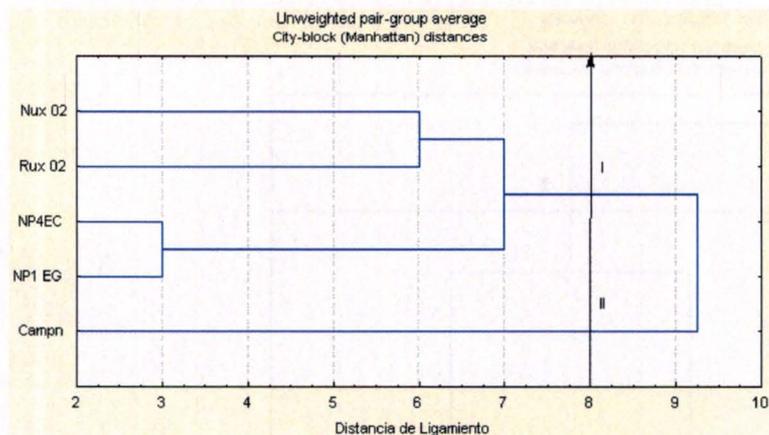


Figura 22. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas para su composición de proteínas totales de hoja. Grupos I y II.

En base a las variantes moleculares detectadas, en la electroforesis de amplificaciones con SSR (cebador 6 y 9) en geles de poliacrilamida al 8%, se clasificaron las accesiones en cuatro grupos (Figura 23). El grupo I está conformado por las accesiones de frutos color naranja (Nux 02 y NP₄EC). El grupo II es la accesión color rojo (Rux 02). El grupo III está conformado por la accesión de frutos de color naranja (Campn) y el grupo IV, por los de color amarillo (NP₁EG).

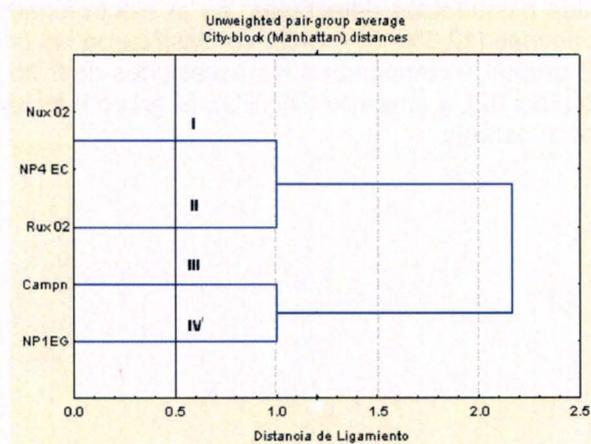


Figura 23. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas con SSR. Grupos I, II, III y IV.

En base a las variantes moleculares detectadas, en la electroforesis de amplificaciones con RAPDs (cebador turbek 03, 04, 11, 12 y 19) en geles de agarosa al 3%, se clasificaron las accesiones en cinco grupos (Figura 24) lo que permite corroborar que cada accesión es un genotipo diferente.

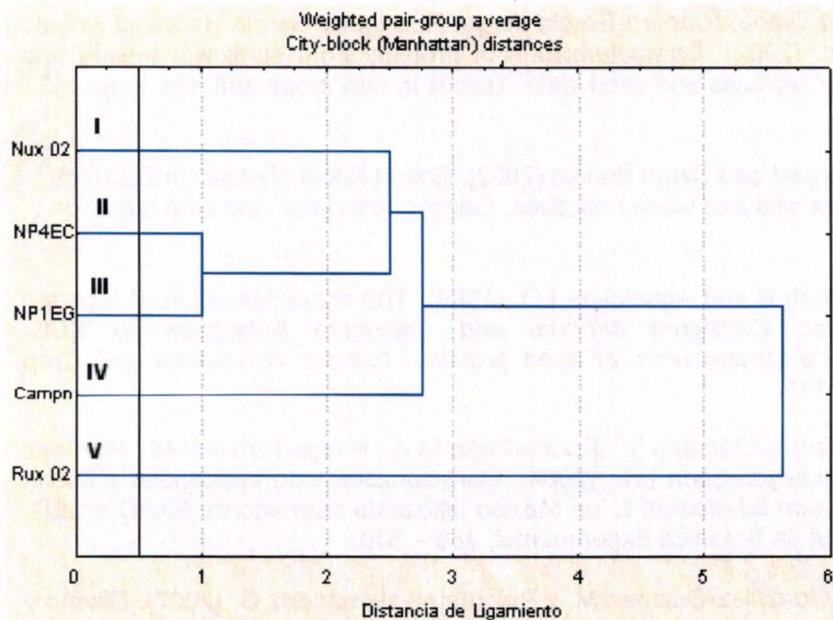


Figura 24. Dendrograma UPGMA basado en el análisis de similitud genética (Coeficiente de Manhattan) de 5 accesiones de chile habanero evaluadas con RAPDs. Grupos I, II, III, IV y V.

BIBLIOGRAFÍA

Adetula O.A. (2006). Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polimorphic DNAs. African Journal of Biotechnology. 5 (2): 120-122.

Jasso de Rodríguez Diana, Romero-García Jorge, Rodríguez-García Raúl and Angulo Sánchez José Luis. (2002). Characterization of proteins from sunflower leaves and seed: relationship of biomass and seed yield. Trends in new crops and new uses. 143 - 149.

Karihaloo, Kaur Manjeet and Singh Sonika (2002). Seed protein diversity in *Solanum melongena* L. and its wild and weedy relatives. Genetic resources and crop evolution. 49: 533 – 539.

Odeigah P.G.C., Oboh B and Aghalokpe I.O. (1999). The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. Genetic Resources and Crop Evolution. 46: 127–131.

Orona-Castro F., Pecina-Quintero V., Rocha-Peña M.A., Parga-Torres V.M., Martínez de La Vega O. y Almeyda-León I.H.. (2004). Caracterización de variedades y líneas élite de papa *Solanum tuberosum* L. en México utilizando marcadores RAPD y SSR. Revista Internacional de Botánica Experimental. 289 – 300.

Palop-Esteban M., González-Gúzman M. y Palomares-Hernández G. (2007). Diseño y análisis de marcadores moleculares para la diferenciación de cultivares de pimiento. Escuela técnica superior de Ingenieros Agronomos.

Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., and Rafalski A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-38.

Singh A. K, Singh Major, Singh A. K., Singh Rakesh, Kumar Sanjeev and Kalloo G. (2006). Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. Current Science. 90 (5) : 711-716.

Vladova R., Tsanev V. and Petcolicheva K. (2004) Seed storage proteins in *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* species. Biologia Plantarum. 48 (4): 601-603.

Yong-Sham Kwon, Je-Min Lee, Gi-Bum Yi, Seung-In Yi, Kyung-Min Kim, Eun-Hee Soh, Kyung-Mi Bae, Eun-Kyung Park, In-Ho Song and Byung-Dong Kim. (2005). Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Mol. Cells. 19 (3): 428-435.

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN GENERAL

En la actualidad, se le ha brindado una gran atención a la caracterización del germoplasma vegetal y conocer sus relaciones genéticas mediante el uso de marcadores genéticos, con el fin de hacer establecer estrategias adecuadas para su uso y conservación. El uso de técnicas como la electroforesis de proteínas en semillas y hojas ha resultado de particular utilidad para la caracterización e identificación varietal en diversas especies de importancia agrícola (Odeigah *et al.*, 1999). Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo mostró una notable similitud en el contenido de proteínas entre las accesiones de *Capsicum chinense* evaluadas variando solamente la composición de proteínas entre éstas dada la presencia de 59 kDa, 51 kDa y 48 kDa bandas polimórficas especialmente en semillas. Debido a que estos son en general mas influidos por el ambiente, se han desarrollado tecnologías basadas en el análisis de la variación a nivel de ADN genómico que permiten contar con un mayor número de marcadores y rastrear no solo las variaciones presentes en las regiones codificantes sino también en las no codificantes. Dentro de estas tecnologías destacan aquellas basadas en la técnica de PCR como son los marcadores RAPDs y SSRs. Aunque se conoce que los marcadores RAPDs tienen la desventaja de no ser siempre muy reproducibles (Demeke *et al.*, 1993), en el presente trabajo se estandarizó la técnica de modo que fue posible lograr una adecuada reproducibilidad y repetibilidad en los ensayos. Por otro lado los resultados obtenidos permitieron corroborar que los marcadores microsatélites detectados en este trabajo resultaron también muy reproducibles y polimórficos. Por esta vía fue posible detectar la presencia de bandas polimórficas en las accesiones de *Capsicum chinense* evaluadas, por lo que al igual que los RAPDs pueden resultar muy útiles como herramienta para evaluar los niveles de variación genética presente en esta especie (Ashkenazi *et al.*, 2000 y Raker *et al.*, 2002). En relación a la clasificación molecular de las accesiones efectuadas tanto desde el punto de vista bioquímico como molecular se pudo apreciar variaciones en la composición de los grupos formados en dependencia del sistema de marcador utilizado (Fig. 21 - 24). Esto es de esperar considerando que cada marcador rastrea regiones diferentes del genoma. Por ello es conveniente para lograr una mayor comprensión de las relaciones genéticas en el germoplasma bajo estudio considerar diferentes tipos de marcadores genéticos. Cabe por otra parte significar que los marcadores de SSRs y RAPDs detectados en el presente estudio diferenciaron los 5 genotipos evaluados. La similitud genética detectada entre algunos de las accesiones evaluadas es de esperar en base a sus características morfológicas y puede contribuir en los programas de mejoramiento del chile habanero diseñando cruzamientos en los que se pueda lograr potencial un mayor vigor híbrido. También los resultados obtenidos pueden servir de base para proteger los derechos de propiedad del germoplasma liberado, así como en la producción y verificación de la pureza genética de la semilla.

BIBLIOGRAFÍA

Ashkenazi V., Chani E., Lavi U., Levy D., Hillel J., Veilleux R.E. (2000). *Genome* 44: 50.

Demeke T., Kawchuk L.M., Lynch D.E. (1993). *Am Potato Jour.* 70: 561.

Odeigah P.G.C., Oboh B and Aghalokpe I.O. (1999). The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 46: 127–131.

Raker M.C. and Spooner D.M. (2002). *Crop. Sci.* 42: 1451.

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

Las proteínas totales no resultaron un sistema bioquímico adecuado ni confiable para diferenciar accesiones de chile habanero.

Solo los cebadores 6 y 9 de microsatélites (SSR), específicos de *Capsicum*, permitieron diferenciar accesiones de chile habanero con una eficiencia del 80%, mientras que los marcadores RAPDs permitieron diferenciar las 5 accesiones con el 100% de eficiencia.

Se pudo demostrar que las cinco accesiones estudiadas difieren genéticamente entre sí, aunque tres de ellas pertenecen al mismo tipo de chile habanero (naranja), por lo que cada accesión puede ser considerada como un genotipo de la especie, diferente.

5.2 PERSPECTIVAS

En este estudio se tomaron 5 genotipos élites, con características morfoagronómicas sobresalientes. Estos se caracterizaron bioquímica y molecularmente para su identificación, lo que revela una completa información de las características moleculares y genéticas entre las accesiones. Esta información es necesaria para establecer diversidad y variabilidad genética entre ellas, permitiendo un registro y una protección de las mismas. Esta información es necesaria para subsecuentes programas de mejoramiento genético.

Es recomendable realizar estudios posteriores a un mayor número de accesiones de chile habanero. Estas accesiones pertenecen a una colección que integra al germoplasma de la Dra. Nancy Santana. Éstas podrán ser evaluadas con dichos marcadores para completar la identificación de cada una de ellas.

