



VARIETADES DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) IDENTIFICADAS MEDIANTE MARCADORES RAPD¹

[VARIETIES OF CHILE (*Capsicum annuum* L.) IDENTIFIED BY RAPD MARKERS]

Valeria Bobadilla-Larios¹, Edgar Esparza-Ibarra¹, Lucía Delgadillo-Ruiz^{1*}, Perla Gallegos-Flores¹ and Jorge Luis Ayala-Lujan²

¹ Laboratorio de Biotecnología, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus II. Av. Preparatoria, colonia Hidráulica, Zacatecas, Zac., México. Email: luciadelgadillo@uaz.edu.mx

² Laboratorio de Patología y Diagnóstico Molecular, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus I. Carretera Zacatecas-Guadalajara Km 6, Ejido la Escondida, Zacatecas, Zac., México

*Corresponding author

RESUMEN

En México existe gran diversidad de especies y variedades de chile con gran importancia cultural, gastronómica y económica. La especie domesticada *Capsicum annuum* agrupa la mayoría de los tipos cultivados y es la más importante en México y el mundo; esta importancia radica en la riqueza genética que posee, por ende, existe la necesidad de estudiarla mediante técnicas moleculares de análisis genético, por lo que, el objetivo fue analizar variedades de *C. annuum* de polinización libre y variedades criollas entre sí, mediante marcadores RAPD (polimorfismo del ADN amplificado al azar), para medir la eficiencia de los iniciadores OPA y la detección de polimorfismos. Se utilizaron seis variedades de *C. annuum* del tipo “ancho” y “mirasol”, clasificadas en variedades de polinización libre y criollas. Las variedades fueron sometidas a un análisis RAPD con los iniciadores OPA 02, OPA 11 y OPA 20. Los resultados obtenidos mostraron poca variabilidad entre las seis variedades de *C. annuum* y el dendograma mostro dos agrupaciones principales, clasificándolas de acuerdo a su nivel tecnológico. Por lo que, los RAPD son una herramienta útil en la detección de variación y poseen gran poder para la estimación de las similitudes genéticas en *C. annuum*.

Palabras clave: Marcadores moleculares; filogenética; variación genética.

SUMMARY

In Mexico there is a great diversity of species and varieties of chile with great cultural, gastronomic and economic importance. The domesticated species *Capsicum annuum* groups most of the cultivated types and is the most important in Mexico and the world; it is important to consider the genetic richness, therefore, there is a need to study it through molecular techniques of genetic analysis. For that reason, the objective was to analyze *C. annuum* varieties of free pollination and creole varieties among themselves, using RAPD markers (random amplified DNA polymorphism), to measure the efficiency of OPA primers and the detection of polymorphisms. Six varieties of *C. annuum* of the "ancho" and "mirasol" types we used, classified in free pollination and criollas varieties. The varieties they submitted to a RAPD analysis with the initiators OPA 02, OPA 11 and OPA 20. The results showed little variability between the six varieties of *C. annuum* and the dendrogram showed two main groups, classifying them according to their technological level. Therefore, the RAPD are a useful tool in the detection of variation and have great power for the estimation of the genetic similarities in *C. annuum*.

Key words: Molecular markers; phylogenetic; genetic variation.

¹ Submitted June 30, 2017 – Accepted October 18, 2017. This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

La especie *Capsicum annuum* se cultiva principalmente en los estados de Chihuahua (chile jalapeño y chilaca), Sinaloa (chile *Anaheim*), Zacatecas (chile poblano), San Luis Potosí (chile serrano), Sonora (chile poblano, jalapeño, *Anaheim*, serrano y *Bell pepper*), Michoacán (chile jalapeño), Guanajuato (chile poblano) y Tamaulipas (chile serrano) (SAGARPA, 2016); y presentan la mayor variabilidad morfológica en tamaño, forma, color de frutos, así como la mayor variabilidad genética (Hernández *et al.*, 2001).

Con el uso de modernas herramientas biotecnológicas diversas estrategias de análisis genético están disponibles y se han aplicado en el estudio de los recursos fitogenéticos. Entre estas herramientas se encuentran los marcadores moleculares que pueden ser definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente. Se puede considerar como marcador a cualquier molécula orgánica e inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso (Azofeifa, 2006).

Los marcadores del ADN se basan en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Rentarías, 2007). Entre los análisis con marcadores moleculares de ADN se encuentran: a) polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), b) amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs), c) amplificación arbitraria por reacción en cadena de la polimerasa (AP-PCR), d) huella genética de ADN amplificado (DAFs), e) polimorfismos de microsatélites amplificados al azar (RAMPOS), f) polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) y g) secuencias simples repetidas o microsatélites (SSRs); todas éstas son estrategias utilizadas en *Capsicum* para la caracterización molecular (Oyama *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2012).

Los marcadores moleculares comparados con análisis morfológicos o de proteínas tienen la ventaja de detectar las variaciones directas en el ADN, se comportan de manera estable, carecen de efectos pleiotrópicos y no son afectados por el ambiente. Estos métodos moleculares se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y permiten caracterizar genomas de diferentes organismos, detectar y aislar genes, así como diferenciar organismos relacionados genéticamente (Rentarías, 2007).

Los marcadores RAPD son un sistema de detección de polimorfismos en la secuencia de ADN, que

consiste en la amplificación de ADN con iniciadores pequeños (generalmente de diez nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias no palindrómicas. La presencia o la ausencia de las bandas entre individuos se deben a cambios en la secuencia (o la pérdida) de los sitios a los que se alinea el iniciador (Rentarías, 2007).

En Zacatecas el cultivo de *C. annuum* es de importancia económica y alimentaria, es una fuente importante de empleos directos durante el ciclo agrícola primavera verano. En 2016 se dedicaron a este cultivo aproximadamente 41,000 ha, lo que represento el 31.5% de la superficie destinada para su cultivo a nivel nacional, donde se obtuvo aproximadamente el 19% del total nacional de la producción de chile, esto puede atribuirse a que en el estado de Zacatecas se obtienen en promedio 10.29 ton ha⁻¹ en comparación con las 17.52 ton ha⁻¹ que reporta SIAP-SAGARPA como rendimiento promedio nacional (SIAP-SAGARPA, 2017). Se estima que en México el consumo *per cápita* es de 16 kg de *C. annuum* en fresco al año (SAGARPA, 2017), mientras que de arroz (*Oryza sativa*) es de 7 kg y de frijol (*Phaseolus vulgaris*) 11 kg (Delgadillo *et al.*, 2016), es ahí donde radica la importancia alimentaria de dicho cultivo.

Las variedades de *C. annuum* se clasifican en tres categorías según el nivel tecnológico empleado: (1) variedades híbridas, (2) variedades de polinización libre y (3) variedades criollas. Los híbridos en teoría representan el nivel tecnológico más alto, mientras que los criollos el nivel más bajo. Por lo que, el objetivo de este estudio fue analizar variedades de *C. annuum* de polinización libre y variedades criollas entre sí, mediante marcadores RAPD, para medir la eficiencia de los iniciadores OPA y la detección de polimorfismos en *C. annuum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN

El material vegetal que se utilizó fueron plántulas de *C. annuum* proporcionadas por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) campo experimental Zacatecas (CEZAC). Las variedades utilizadas fueron de dos tipos: ancho y mirasol.

Tipo ancho con las variedades:

- Testigo Calera (criollo)
- Tres venas villista 1 (criollo)
- Dos venas villista 2 (criollo)

Tipo mirasol con las variedades:

- 2 venas INIFAP (criollo)
- Don Luis, SLP (polinización libre)
- Don Ramón, SLP (polinización libre)

Se trabajó con hojas sanas y frescas de plantas de chile de 18 semanas de desarrollo, la siembra de la plántula se realizó en invernadero, con 10 individuos por variedad. En cada una de las poblaciones se registró la información en forma grupal.

Extracción del ADN

Del material vegetal solo se usó el tejido foliar, éste se desprendió con pinzas metálicas evitando en todo momento el contacto directo con las hojas para no contaminar con enzimas DNAasas exógenas. El tejido foliar fue molido en mortero y con nitrógeno líquido. Inmediatamente se pesaron 100 mg de tejido pulverizado en un Eppendorf, utilizando una balanza semianalítica, y se procedió a la extracción de ADN utilizando el kit DNeasy Plant Mini, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuantificación del ADN

La cuantificación del ácido nucleico obtenido de cada muestra se llevó a cabo en un espectrofotómetro (Quawell UV spectrophotometers Q5000); su pureza fue determinada considerando relaciones de absorbancia de 260/280 y 260/230 nm.

Amplificación del ADN

El ADN extraído se usó como molde para su amplificación en las subsecuentes reacciones en cadena de la polimerasa (Mullis, 1990). Para la PCR se usó como control los iniciadores que amplifican el gen β -tubulina de expresión constitutiva (*housekeeping*) con el fin de verificar la viabilidad de amplificación del ADN genómico extraído (β -tub forward 1:5'- ATGCAAGAAAGCCTTGCGAC-3'; β -tub reverse 2: 5'- TTTGCAGTATCTCAGTGTTC-3').

La PCR se llevó a cabo con las mezclas de reacción conteniendo: 50-78 ng de ADN genómico

aproximadamente, 2 mM de MgCl₂, 0.4 μ M dNTPs, 0.6 mM de β Tubulina, 1.25 U de Taq ADN polimerasa, 1X Buffer de KCl, en un volumen final de 25 μ L.

El programa de amplificación fue: 2 minutos a 95 °C, seguido por 5 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 30 segundos a 58 °C, 45 segundos a 72 °C, y un paso final a 72 °C por 5 minutos. El molde resultante se almacenó en refrigeración hasta su uso (Flores *et al.*, 2008). Para realizar RAPD's se eligieron tres iniciadores: 1) OPA 02, 2) OPA 11 y 3) OPA 20 sintetizados por invitrogen (Tabla 1) (González *et al.*, 2011).

Se realizó la PCR con las mezclas de reacción que contenían: 50-78 ng de ADN genómico aproximadamente; 2 mM de MgCl₂; 0.4 μ M dNTPs; 0.4 μ M de cada iniciador; 1 unidad de Taq ADN polimerasa; 1X Buffer de (NH₄)₂SO₄; en un volumen final de 25 μ L. Después el ADN fue amplificado en un termociclador Thermal Cycler. El programa de amplificación fue: 2 minutos a 95°C seguido por 44 ciclos a: 95°C por 30 segundos, 1 minuto a 36°C, 45 segundos a 72°C, y un ciclo final a 72°C por 5 minutos (González *et al.*, 2011).

Electroforesis

El grado de pureza e integridad física de ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para DNA y 1.5% para productos amplificados, en un sistema continuo a base de TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA) con bromuro de etidio. El corrimiento se realizó durante 50 min a 80 V cm⁻¹ constantes. Los geles fueron visualizados mediante irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador (Wise UV wuv-L50). Se documentó el patrón electroforético logrado en un fotodocumentador EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System) con sistema de análisis (kodak 1200 digital science) (Flores *et al.*, 2008).

Tabla 1. Porcentaje de polimorfismo en seis variedades de *C. annuum*.

Iniciador	Secuencia de iniciador (5' - 3')	Total de bandas amplificadas	Total de bandas Polimórficas	% de polimorfismo	Eficiencia iniciador (%)
OPA 02	TGCCGAGCTG	11	5	45.45	36.66
OPA 11	CAATCGCCGT	8	1	12.5	26.66
OPA 20	GTTGCGATCC	11	3	27.27	36.66
Total		30	9	30	-

Análisis de los datos obtenidos

Estimación del tamaño, denominación y análisis de las bandas de ADN. A partir de la imagen realizada al gel de electroforesis de agarosa se procedió a la estimación del tamaño y la denominación de las bandas obtenidas.

Análisis de similitud y dendograma. Con los resultados de la amplificación se elaboró una matriz de resultados 0/1 donde se evaluó las bandas como ausente (0) o presente (1) para cada uno de los materiales estudiados. Las estimaciones de similitud genética mediante la matriz obtenida se calcularon de acuerdo al índice de similitud de Jaccard (1908). Se construyó un dendograma usando la técnica *Cluster análisis* empleando el método de agrupamiento media aritmética no ponderada (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). Además, se realizó la prueba estadística Bootstrap con 5000 remuestreos. Todos los análisis estadísticos, visualización y edición de dendograma se llevaron a cabo mediante tres softwares Free Tree, Tree View y Fig Tree (Hampl *et al.*, 2001).

Análisis de los polimorfismos obtenidos por cada iniciador. A partir de la matriz de 0/1 creada por los patrones de bandas se identificaron las bandas comunes o monomórficas (que aparecen en todas las variedades) y bandas polimórficas (que aparecen sólo en algunas variedades) amplificadas por un iniciador. Con base en esto, se calculó el porcentaje de polimorfismo que se obtuvo con cada iniciador, además se determinó el porcentaje de eficiencia de un iniciador, esto se estimó como un porcentaje del número total de bandas amplificadas por el iniciador entre el número total de bandas amplificadas por todos los iniciadores a través de todas las variedades, el cual representa la disponibilidad de secuencias complementarias al iniciador en el genoma (Vos *et al.*, 1995; Alberti *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo ADN genómico a una concentración promedio de 14 ng/ μ L. En los ensayos de tipo RAPD se emplearon tres iniciadores: OPA 02, OPA 11, OPA 20. Las figuras 1, 2 y 3 muestran el patrón de bandeo obtenido con los iniciadores para todas las variedades empleadas. Con todos los iniciadores se obtuvieron productos de amplificación. Una banda polimórfica se definió como aquella que está presente a una frecuencia mayor al 1% y menor al 100% (Lewin, 1997). Por lo tanto, una banda que esté presente en todos los patrones génicos tendrá una frecuencia del 100% y es llamada banda no polimórfica. En el análisis de similitud y dendograma solo se consideraron aquellas bandas que se distinguieron como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel. Se tomaron como idénticas las

bandas que tuvieron el mismo tamaño de pares de bases (pb), la intensidad de las bandas no fue considerada un factor de polimorfismo. La visualización en gel de agarosa no presentó degradación, mostrándose integro el ADN en las seis muestras analizadas.

Los tres iniciadores empleados amplificaron satisfactoriamente y produjeron un total de 30 bandas, con un promedio de 10 bandas por iniciador. El iniciador OPA 02 amplificó un total de 11 bandas (figura 1), OPA 11 amplificó 8 (figura 2) y OPA 20 amplificó 11 (figura 3). De las 30 bandas amplificadas, sólo 9 fueron polimórficas, siendo OPA 02 el iniciador que aportó mayor porcentaje de polimorfismo con 45.45% debido a la amplificación de 5 de estas bandas (tabla 1).

El porcentaje de polimorfismos de los iniciadores fue menor a lo reportado por González *et al.* (2011). Ellos reportan valores de 66.7% para OPA 11 y 81.25% para OPA 20. Así mismo Bhadrachandrar y Chandrasherker (2011) reportaron un valor de 75% para OPA 11, estos valores pueden considerarse como altos en comparación con lo que se obtuvo en este trabajo que fue de 12.5% para OPA 11 (tabla 1). Los resultados de la tabla 1 pudieran deberse a las variaciones del método empleado, sin embargo, para el caso de OPA 02 los valores son semejantes a los de González *et al.* (2011) y Tamay *et al.* (2013) con valores entre 40% y 50% de polimorfismos.

La eficiencia correspondiente a la amplificación de los iniciadores oscila entre 26.66% (OPA 11) y 36.66% (OPA 02 y OPA20) (tabla 1). Estos valores del iniciador indican una amplia zona del genoma que complementa y permite el apareamiento de bases entre el iniciador y el ADN genómico. Además, se ha sugerido que la alta eficiencia se correlaciona positivamente con el alto contenido de GC del amplificado (Fristch *et al.*, 1993; Karp y Edwards, 1997). Esta sugerencia, sin embargo, no coincide con los resultados del presente trabajo como se observa en el OPA 02 (con 70% GC) y el iniciador OPA 20 (con 60% GC) que tienen eficiencias equivalentes a 36.66% cada uno. La eficiencia depende del número total de bandas amplificadas por el iniciador y esto incluye las más comunes (monomórficas) que representan secuencias conservadas, siendo un parámetro poco informativo para la diferenciación, por lo tanto, a pesar de poseer la misma eficiencia de amplificación OPA 20 y OPA 02, este último posee el poder discriminatorio más alto.

El coeficiente de similitud varió desde 0.74 hasta 0.96 con un valor medio de 0.85 (tabla 2). El grado de similitud entre las variedades de chile ancho tres venas villista y mirasol Don Luis, SLP; y ancho testigo Calera y mirasol Don Luis, SLP mostró la

variación genética más alta con el valor para los coeficientes de similitud de 0.74 y 0.75, respectivamente (tabla 2). Considerando que, se encontró que el valor de similitud más alto de 0.96

entre mirasol Don Luis, SLP y mirasol Don Ramón, SLP.

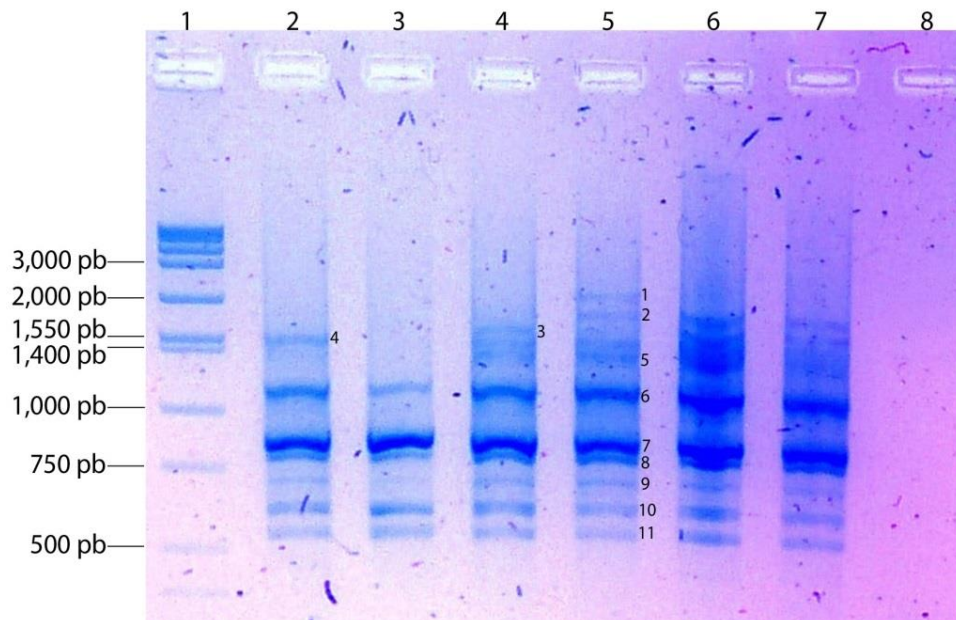


Figura 1. RAPD con los iniciadores OPA 02. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt. Carril 1) marcador de tamaño molecular (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker). Carril 2) Ancho testigo Calera. Carril 3) Ancho tres venas villista 1. Carril 4) Ancho dos venas villista 2. Carril 5) Mirasol 2 venas INIFAP. Carril 6) Mirasol Don Luis, SLP. Carril 7) Mirasol Don Ramón, SLP. Carril 8) Control negativo (agua). Los números dentro de cada gel indican las bandas polimórficas analizadas.

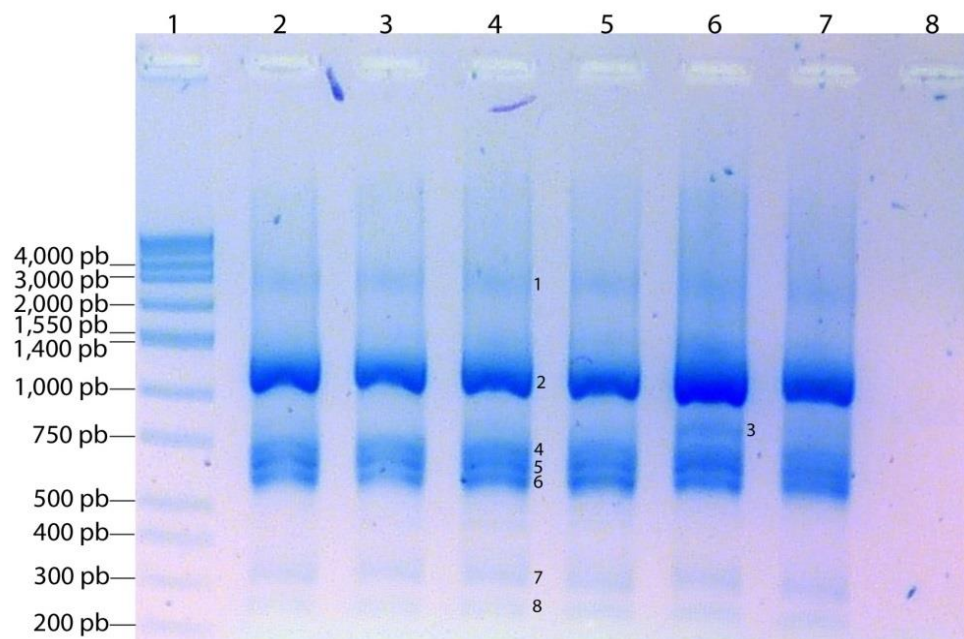


Figura 2. RAPD con los iniciadores OPA 11. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt. Carril 1) marcador de tamaño molecular (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker). Carril 2) Ancho testigo Calera. Carril 3) Ancho tres venas villista 1. Carril 4) Ancho dos venas villista 2. Carril 5) Mirasol 2 venas INIFAP. Carril 6) Mirasol Don Luis, SLP. Carril 7) Mirasol Don Ramón, SLP. Carril 8) Control negativo (agua). Los números dentro de cada gel indican las bandas analizadas.

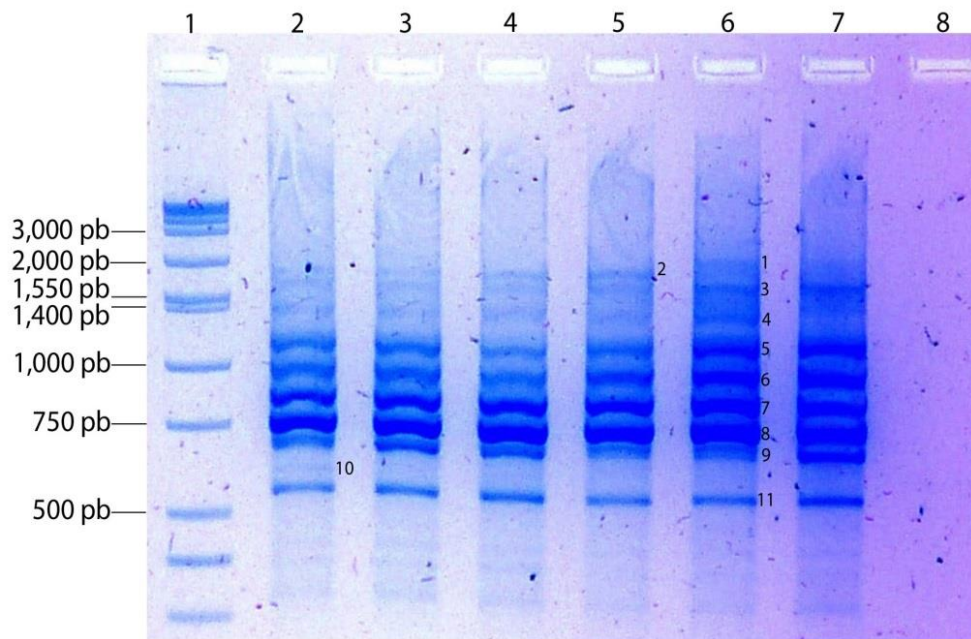


Figura 3. RAPD con los iniciadores OPA 20. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con BrEt. Carril 1) marcador de tamaño molecular (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker). Carril 2) Ancho testigo Calera. Carril 3) Ancho tres venas villista 1. Carril 4) Ancho dos venas villista 2. Carril 5) Mirasol 2 venas INIFAP. Carril 6) Mirasol Don Luis, SLP. Carril 7) Mirasol Don Ramón, SLP. Carril 8) Control negativo (agua). Los números dentro de cada gel indican las bandas analizadas.

Tabla 2. Matriz de distancia genética entre las seis variedades de *Capsicum annuum* como se deduce de los marcadores RAPD.

	1	2	3	4	5	6
1	0					
2	0.91304	0				
3	0.88000	0.87500	0			
4	0.84615	0.84000	0.88462	0		
5	0.75000	0.74074	0.85185	0.82143	0	
6	0.77778	0.76923	0.88462	0.85185	0.96154	0

1) Ancho testigo Calera, 2) Ancho tres venas villista 1, 3) Ancho dos venas villista 2, 4) Mirasol 2 venas INIFAP, 5) Mirasol Don Luis, SLP y 6) Mirasol Don Ramón, SLP.

Los resultados de similitud que se obtuvieron indican poca variabilidad. Una posible respuesta está dada por la estrecha relación filogenética de los materiales empleados, así como la elección de los iniciadores y la naturaleza de este tipo de marcadores los cuales, al ser arbitrarios, pudieron hibridar en regiones del ADN que no estaban relacionadas con el carácter diferenciador. A pesar de esto, los valores que se obtuvieron, tienen una correspondencia con el nivel tecnológico de estas variedades, como se puede observar en los grupos de mayor variación en donde se contraponen variedades criollas con variedades de polinización libre, y en el grupo de mayor similitud donde se comparte el nivel tecnológico de polinización libre. Demostrando la capacidad de la

técnica RAPD para diferenciar y agrupar variedades según su nivel tecnológico.

A pesar de la alta similitud genética presentada por los materiales, los RAPD han demostrado la gran capacidad que poseen para medir la variabilidad genética, sobre todo en estudios de diversidad, sin embargo en estos estudios se presentan diferentes objetivos, como la colecta, caracterización, multiplicación, conservación, evaluación, enriquecimiento genético, mejoramiento de cultivos e intercambio de germoplasma (Pacheco *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2013; Kraft *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015), y usando principalmente materiales silvestres o procedentes de programas de mejoramiento y bancos de germoplasma, a diferencia de los

materiales utilizados en la presente investigación, que son de uso común entre los agricultores de la región como es el caso de los materiales de *C. annuum* criollos y un poco más restringidos los de *C. annuum* de polinización libre pero disponibles en calidad de certificados.

Con los resultados obtenidos del índice de similitud de Jaccard (1908) se generó un dendrograma que agrupa las variedades de *C. annuum* utilizando el método de análisis UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) (Sneath y Sokal, 1973). El cual divide a las seis variedades de *C. annuum* en dos grupos principales con los códigos (A) y (B) (figura 4). El grupo (A) posee la rama más fuerte, con un 87%, se conforma con las variedades de *C. annuum* de polinización libre, las cuales son mirasol Don Luis, SLP y mirasol Don Ramón, SLP. El grupo (B) lo integran las variedades criollas de calidad, presentando un 36% de robustez en el agrupamiento, el cual se divide en dos subgrupos con los códigos (C) y (D) mostrando un 54% y 26% de robustez respectivamente, el subgrupo C conformado con las variedades ancho testigo Calera y ancho tres venas villista, y el subgrupo D con mirasol dos venas INIFAP y ancho dos venas villista 2 (figura 4).

A pesar que no se obtuvo una alta variación genética entre variedades de *C. annuum*, en el dendrograma obtenido se observa que los iniciadores OPA utilizados en este estudio lograron agrupar coherentemente a las variedades diferenciando a variedades de polinización libre grupo (A), y a las variedades criollas de calidad grupo (B), denotando variabilidad entre materiales debido a su nivel tecnológico, que implica la capacidad de identificar a base de RAPD los materiales con mayor uniformidad genética, debida a su proceso de selección y mejoramiento, el subgrupo (D), de variedades criollas con la característica “dos venas” se integró por los grupos: A3 y M4; una perteneciente al tipo mirasol y la otra a tipo ancho, esta agrupación resulta interesante, ya que comparten el mismo carácter morfológico (dos venas), tomando en cuenta que esté se utiliza como una característica para lograr uniformidad al llevar a cabo la selección de criollos de calidad, el proceder de un origen de selección parecido puede ser motivo de la similitud presente entre este grupo, aunque el hecho de que la variedad mirasol no se agrupara con las variedades de su mismo tipo se puede deber a que estas son de polinización libre, y provienen de la autofecundación controlada de un solo progenitor con alta pureza genética, con subsiguientes selecciones, que derivan de una alta homología entre las mismas.

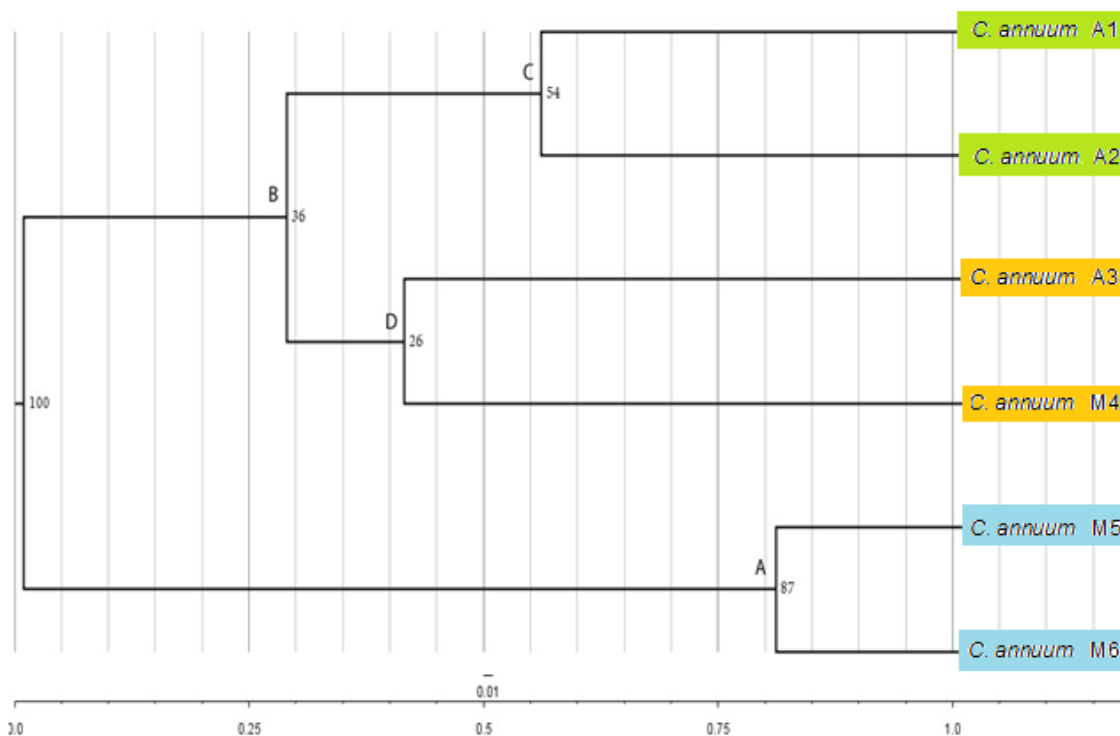


Figura 4. Distancias genéticas entre los genotipos de *C. annuum* estudiados. Obtenidas por el análisis RAPDs utilizando el índice de similitud de Jaccard (1908), y el método de agrupamiento UPGMA. El número en los nodos, corresponden al valor de robustez de los datos (Bootstrap) que soporta a la rama del árbol después de 5000 réplicas.

Por último, el subgrupo C, con ancho testigo Calera y ancho tres venas villista, la primera no paso por el proceso de selección de lóculos o venas, esta fue la agrupación con el segundo nivel de más alta similitud con un coeficiente de 0.91 (tabla 2). Todas estas agrupaciones denotan alta similitud genética en la secuencia de estas variedades, reflejada en la poca variabilidad obtenida, pero se logran diferenciar, corroborando que estos marcadores moleculares poseen potencial en el análisis molecular de *C. annuum*.

CONCLUSIÓN

Los marcadores RAPD mostraron variación genética entre las variedades utilizadas de *C. annuum*, las variaciones se agruparon según su nivel tecnológico (criollo o polinización libre). El valor de los iniciadores indica que OPA 02 es el más polimórfico y el OPA 20 el que más fragmentos generó. Es decir, el uso de marcadores RAPD permite identificar la variabilidad genética y polimorfismo genético que existe entre las diferentes variedades de *C. annuum*.

REFERENCIAS

- Alberti, E., Fraga, J., García, R., Hernández, E., de la Cuetara, K., Castillo, L. y Serrano, T. (2011). Estudio del polimorfismo genético de las células de la médula ósea y del sistema nervioso central de ratas mediante la técnica de RAPD. *Revista Colombiana Biotecnología*, 13(1): 42-51.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2):221-242
- Bhadragoudar, M. and Chandrasherkar, P. (2011). Assessment of genetic diversity among *Capsicum annuum* L. genotypes using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*. 10(76), 17477-17483. doi: 10.5897/AJB11.497
- Delgadillo-Ruiz, O., Ramírez-Moreno, P. P., Leos-Rodríguez, J. A., Salas González, J. M., y Valdez-Cepeda, R. D. (2016). Pronósticos y series de tiempo de rendimientos de granos básicos en México. *Acta Universitaria*, 26(3), 23-32. doi: 10.15174/au.2016.882.
- Flores-Camacho, R., Atkins, S. D., Manzanilla-López, R. H., Prado-Vera, I. C. D., y Martínez-Garza, Á. (2008). Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 93-104.
- Fristch, P., Hanson, M. A., Spore, C. D., Pack, P. E. and Riseberg, L. H. (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 10-20. doi: 10.1007/BF02670555
- González, I., Arias, Y., Quiñones, M., Miranda, I., Rodríguez, Y. y Peteira, B. (2011). Variabilidad molecular de genotipos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) del programa de mejoramiento genético para la resistencia a PVY. *Protección Vegetal*, 26 (2), 69-72.
- Hernández-Verdugo, S. Luna-Reyes, R. and Oyama, K. (2001). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* from Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 226, 129-142. doi: 10.1007/s10722-004-2363-1
- Hapl, V., Pavlíček, K. and Flegr J. (2001). Construction and bootstrap analysis of ADN fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 731-73. doi: 10.1099/00207713-51-3-731
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44, 223-270.
- Karp, A. and Edwards, K. J. (1997). DNA markers a global overview. In: G. Caetano-Anolle's and P.M. Gresshoff, (eds DNA Markers Protocols, Application and Overviews). Wiley, New York. pp. 1-13.
- Kraft, K. H., de Jesús Luna-Ruiz, J., and Gepts, P. (2013). A new collection of wild populations of *Capsicum* in Mexico and the southern United States. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(1), 225-232. doi: 10.1007/s10722-012-9827-5
- Kraft, K. H., Brown, C. H., Nabhan, G. P., Luedeling, E., Ruiz, J. D. J. L., d'Eeckenbrugge, G. C., Hijmans, R. J. and Gepts, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6165-6170. doi: 10.1073/pnas.1308933111

- Lewin, B. (1997). *Genes VI*. Oxford University Press and Cell Press. Printing in U.S.A.
- Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 264(4): 56-61.
- Oyama, K., Hernández-Verdugo, S., Sánchez, C., González-Rodríguez, A., Sánchez-Peña, P., Garzón-Tiznado, J. A. and Casas, A. (2006). Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (*Solanaceae*) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 553-562. doi: 10.1007/s10722-004-2363-1
- Pacheco-Olvera, A., Hernández-Verdugo, S., Rocha-Ramírez, V., González-Rodríguez, A. and Oyama, K. (2012). Genetic diversity and structure of pepper (*Capsicum annuum* L.) from northwestern Mexico analyzed by microsatellite markers. *Crop Science*, 52, 231-241. doi: 10.2135/cropsci2011.06.0319
- Pérez, C. L., Castañón, N. G., Ramírez, M. M. y Mayek, P. N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum spp.* *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2 (4), 117-128. doi: <http://dx.doi.org/10.19136/era.a2n4.721>
- Rentaría, A. M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*. Cap.18. pp. 541-556.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (2016). Atlas agroalimentario 2016. México. 62-64.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (2017). Producción nacional de chile alcanza 2.3 millones de toneladas. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGENE052017.aspx> [Fecha de consulta: octubre 14 de 2017]
- SIAP-SAGARPA. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/ [Fecha de consulta: octubre 14 de 2017]
- Sneath, H. A. and Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. San Francisco, California, E.U.A.: W. H. Freeman and Company.
- Tamay, D. L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2(2), 70-78.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. and Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.