

**DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE
LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Capsicum***

FÉLIX ALBERTO GUZMÁN DÍAZ

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2007

**DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE
LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Capsicum***

FÉLIX ALBERTO GUZMÁN DÍAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para
optar al título de Magíster en Biología**

Directora

M. CARMEN DE VICENTE, Ph. D.

Co-director

HEIBER CÁRDENAS, M. Sc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2007



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

Jurado conformado por los doctores:

1. JUAN DIEGO PALACIO M.
2. MARIO AUGUSTO GARCÍA D.

El día 16 de Mayo de 2007 a las 5:00 P.M. se llevó a cabo la sustentación de TESIS titulada "DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Capsicum*", presentada por el estudiante **FÉLIX ALBERTO GUZMÁN DÍAZ**, código 0403171, Plan 7180, candidato a grado para la próxima ceremonia.

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN:

APROBADA () MERITORIA () LAUREADA

Regístrese esta calificación.

- () REPROBADA: El estudiante debe matricularse en esta actividad
() PENDIENTE: El estudiante debe acoger las recomendaciones del jurado y presentar nuevamente el documento ante el Director de Tesis. () Requiere. () No requiere nueva sustentación.

El plazo para nueva sustentación y/o presentación del documento es de: _____

OBSERVACIONES:

Acatar observaciones de los evaluadores realizados
en el Documento

Santiago de Cali, 16 de Mayo de 2007.

M. Carmen de Vicente

M. CARMEN DE VICENTE
DIRECTORA

Heiber Cárdenas

HEIBER CÁRDENAS
CODIRECTOR

JONALACIO

JUAN DIEGO PALACIO M.
JURADO

Mario Augusto García D.

MARIO AUGUSTO GARCÍA D.
JURADO

ENR

ENRIQUE JAVIER PEÑA S.
Coordinador Sección Sustentación

Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado “Desarrollo de una herramienta molecular para el estudio de la diversidad genética de germoplasma del género *Capsicum*”, presentado por el estudiante FÉLIX ALBERTO GUZMÁN DÍAZ, para optar al título de Magíster en Biología, fue revisado y calificado como:

Aprobado

M. Carmen de Vicente
Directora

Heiber Cárdenas
Co-director

En memoria de mi padre

A mi madre

A toda mi familia

Porque con su amor le dan vida a mi vida

AGRADECIMIENTOS

Esta actividad se realizó en el marco de una cooperación entre Bioversity International y Cornell University (USA). Agradezco al Departamento de Biología de la Universidad del Valle (Cali, Colombia) por facilitar mi participación en la realización de esta actividad. También expreso mi agradecimiento a M. Carmen de Vicente (Generation Challenge Program, antes Bioversity International) por su gestión, empeño, estímulo y apoyo para la ejecución de todas las actividades involucradas en el desarrollo de este trabajo; a Molly Jahn (University of Wisconsin, antes Cornell University) por su hospitalidad y por ofrecer las instalaciones de su laboratorio de Cornell University; a Heiber Cárdenas (Universidad del Valle) por la supervisión y constante interés en la conclusión cabal de este estudio; y a Shanna Moore, Mary Kreitinger, Sherry Roof y Michael Mazourek (Jahn Lab en Cornell University) por su disposición de ayuda y apoyo durante la realización de esta actividad. Asimismo, manifiesto mi gratitud a todas aquellas personas que fueron guarda y custodios de este trabajo y de su autor.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. MATERIALES Y MÉTODOS	7
1.1 Material vegetal	7
1.2 Extracción de ADN	7
1.3 Microsatélites (Repeticiones de secuencia simple o SSR)	7
1.4 Análisis de datos	9
2. RESULTADOS	11
2.1 Polimorfismo detectado por los microsatélites	11
2.2 Similitud genética entre los genotipos	13
2.3 Marcadores para distinguir entre los genotipos de la misma especie	14
3. DISCUSIÓN	16
3.1 Polimorfismo molecular	16
3.2 Fomento del uso y conservación de los recursos fitogenéticos	18
4. LITERATURA CITADA	21

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Lista de los genotipos usados en este estudio. Las columnas presentan la especie botánica, la abreviatura usada en los análisis de datos, el grupo resultante del análisis de conglomerados, el nombre del genotipo o el número de la entrada y el grado de picante.	25
Tabla 2. Condiciones de amplificación y electroforesis para los 21 SSR evaluados. TE: tiempo de electroforesis en minutos.	28
Tabla 3. Datos sobre el número de alelos, número de alelos raros, número de genotipos con alelos raros y múltiples, rango del tamaño alélico, frecuencia alélica más alta y contenido informativo polimórfico (PIC) observados en los 42 genotipos de <i>Capsicum</i> para los 21 microsatélites. Crom.: cromosoma.	30
Tabla 4. Número de alelos y valores del contenido informativo polimórfico (PIC) observados en los 21 microsatélites dentro de los genotipos de <i>C. annuum</i> , <i>C. baccatum</i> , <i>C. chinense</i> y <i>C. frutescens</i> . n: número de genotipos por especie.	32

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Relaciones genéticas de los 42 genotipos evaluados, obtenidas con los 208 alelos de los 21 SSR usando el coeficiente de similitud de Dice y el método UPGMA.	33
Figura 2. Distribución espacial de los grupos de genotipos, obtenida con el análisis de correspondencia múltiple.	34

RESUMEN

El potencial genético del germoplasma de ají (*Capsicum*) está subutilizado y merece más investigación. La selección cuidadosa de marcadores moleculares es un paso esencial para estimular la comparación mundial de germoplasma de *Capsicum* y para promover su uso y conservación adecuados. Durante este trabajo se evaluó un conjunto de 21 microsatélites, que fueron diseñados para *Capsicum*, empleando un grupo diverso de 42 genotipos de ají que representaron 12 especies de este género. Se detectaron 208 alelos en los 21 loci evaluados. El nivel de polimorfismo entre los 42 genotipos se evaluó calculando el contenido de información polimórfica (PIC) para cada loci. Los valores del PIC estuvieron entre 0.546 (Ng20) y 0.906 (Ng18), con un promedio por marcador de 0.788. En general, se observaron más alelos raros en los microsatélites que detectaron un mayor número de alelos por locus. La evaluación de las relaciones genéticas entre los genotipos a partir de una matriz de datos binarios, a través de un análisis de conglomerados, permitió la agrupación de los genotipos en grupos que se diferenciaron por su grado de similitud genética y que correspondieron a las diferentes especies taxonómicas. Los análisis permitieron concluir que los 21 microsatélites podrían usarse como una herramienta estándar para la evaluación mundial de la diversidad real del germoplasma de *Capsicum* que se conserva tanto en colecciones *ex situ* como *in situ*. Esta es la primera vez que los marcadores microsatélite son usados para evaluar simultáneamente la diversidad genética de 12 especies del género *Capsicum*.

Palabras clave: Microsatélites, diversidad genética, germoplasma, distancia genética

INTRODUCCIÓN

Los frutos del género *Capsicum* son valorados en el mundo entero como especia y hortaliza. Por ejemplo, durante 2005 en los Estados Unidos los ajíes campana y pimienta, los cuales sólo representan una porción de los frutos producidos por las especies de este género, tuvieron en el mercado en fresco un valor superior a los 600 millones de dólares. Esta cifra convirtió al ají en la cuarta hortaliza más comercializada de este país, después del tomate, la lechuga y la cebolla (The National Agricultural Library, <<http://www.nal.usda.gov>> consulta: Marzo de 2007).

Una de las características más sobresaliente del fruto del ají es su sabor picante. Esta condición es conferida por una familia de compuestos alcaloides denominados capsicinoides, la cual es distintiva del género *Capsicum* (Bosland, 1999). La necesidad de ajíes con niveles diferentes de picante va en aumento debido a la creciente demanda del mercado por productos que contengan capsicinoides. Actualmente se requieren ajíes muy picantes para la preparación de las oleoresinas utilizadas en sustancias de defensa (p.e., para controlar motines) y como repelente de animales (Mathur et al., 2000), también para usarlos como insecticida eficaz en la agricultura orgánica. Igualmente, el mercado demanda ajíes que presenten resistencia a patógenos y variantes en características de color, forma y tamaño. Sin embargo, un prerrequisito para producir variedades nuevas y mejorar los cultivares existentes es poseer un conocimiento amplio del germoplasma existente.

Especies del género *Capsicum*

El género *Capsicum* es nativo de América del Sur y América Central (Walsh & Hoot, 2001) e incluye cinco especies domesticadas y unas 25 especies silvestres (IBPGR, 1983). Las cinco especies cultivadas son: *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum chinense*

Jacq., *Capsicum frutescens* L. y *Capsicum pubescens* R. & P. Se han identificado dos centros de domesticación del género: uno en América del Sur para *C. pubescens*, *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, y el otro en México para *C. annuum* (Eshbaugh, 1993). La mayoría de los ajíes explotados comercialmente en el mundo pertenecen a la especie *C. annuum*. El interés por las otras especies está limitado a los mercados locales de las regiones donde son producidas (Eshbaugh, 1993).

A pesar de su importancia mundial, la clasificación taxonómica de *Capsicum* permanece confusa dentro de especies o entre ellas, a lo cual contribuye la utilización de vocablos diferentes (Eshbaugh, 1993). La delimitación dentro de dos complejos de especies del género aún no es clara: (i) el complejo *C. annuum*, formado por *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*, y (ii) el complejo *C. eximium*, compuesto por *C. eximium* y *C. cardenasii* (Walsh & Hoot, 2001). Adicionalmente, los investigadores usan los términos chile o ají como nombres en lengua vernácula, conduciendo a imprecisiones sobre la clasificación e identificación de las especies de *Capsicum*. Asimismo, los términos ají, chili, chile y *Capsicum* usualmente son intercambiados para diferentes especies del género (Andrews, 1996).

Las especies silvestres de *Capsicum* no han sido muy estudiadas. Estas especies a menudo presentan una distribución geográfica restringida a zonas consideradas ecológicamente amenazadas; sin embargo, su germoplasma es de interés para los mejoradores porque contiene genes potencialmente útiles para la resistencia a enfermedades y la tolerancia al estrés abiótico (Bosland & González, 2000). Según el IBPGR (1983), el germoplasma andino de *Capsicum* es una fuente imprescindible de resistencia a las enfermedades que afectan a los ajíes cultivados y un surtidor importante para aumentar el picante y variar el color del fruto. Por lo tanto,

puede considerarse que el potencial del germoplasma silvestre de *Capsicum*, que representa una fuente de diversidad genética importante, está subutilizado y merece más investigación.

Conservación *ex situ* del germoplasma de *Capsicum*

Una colección *ex situ* debe mantener el máximo número de alelos y ser tan pequeña como sea posible para favorecer su conservación eficaz. Sin embargo, el germoplasma es conservado a menudo sin la evaluación de su variabilidad genética, lo cual ha conducido a la formación de colecciones grandes que contienen duplicados de muchas entradas (Hayward & Sackville Hamilton, 1997).

Actualmente existen algunas colecciones grandes de germoplasma de *Capsicum*, entre las que se destacan las mantenidas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por su sigla en inglés; aprox. 3000 entradas) y el Centro Asiático de Investigación y Desarrollo de Hortalizas (AVRDC, por su sigla en inglés; aprox. 7000 entradas). Además, universidades y otras instituciones de 21 países de América Latina y el Caribe tienen bancos que conservan colecciones más pequeñas de germoplasma de *Capsicum* (Knudsen, 2000). No obstante, sólo algunas de estas colecciones han sido parcialmente caracterizadas mediante caracteres morfológicos. Además, ciertas especies de *Capsicum* no están representadas en las colecciones y tal vez nunca serán incluidas, debido a que el desarrollo agrícola y el crecimiento poblacional están reduciendo sus hábitat naturales (Bosland & González, 2000).

Las características morfológicas se han usado tradicionalmente para clasificar las especies; sin embargo, éstas no siempre son suficientes para la clasificación adecuada de una entrada específica en una colección *ex situ*. Por otro lado, este tipo de caracterización requiere gran

cantidad de recursos; p.e., espacio y tiempo (las plantas deben crecer hasta la etapa de floración o fructificación), así como de habilidad para determinar la forma del polen (IBPGR, 1983).

Alternativamente, los marcadores moleculares se han convertido en herramientas importantes para hacer selección en labores de mejoramiento, en la identificación de genotipos y en estudios de evolución y organización de los genomas vegetales (Dettori et al., 2001). El análisis de la estructura genética puede revelar que un banco de germoplasma contiene entradas duplicadas o proporcionar información útil para tomar decisiones acerca del mantenimiento de las entradas morfológicamente similares (Hayward & Sackville Hamilton, 1997).

Entre las herramientas moleculares, los marcadores microsatélite o repeticiones de secuencia simple (SSR) se han convertido en un marcador de ADN usado exitosamente en numerosos estudios; p.e., en la genotipificación de individuos y protección de variedades de olivo (Cipriani et al., 2002), en evaluación de redundancia genética en una colección *ex situ* de sorgo (Dean et al., 1999), en estudios de genética de poblaciones en mangle (Rosero-Galindo et al., 2002), en análisis de la diversidad genética en variedades comerciales de arroz (Siwach et al., 2004), en estudios filogenéticos de maíz (Matsuoka et al., 2002) y en flujo de genes en arroz (Song et al., 2003), por mencionar algunos. Esta técnica molecular es ideal en el diseño de estrategias para la conservación de recursos genéticos y formación de colecciones núcleo (de Vicente, 2002).

Durante este trabajo se evaluó un conjunto de microsátélites, que fueron diseñados para *Capsicum* (Nagy et al., 1998; Lee et al., 2004), empleando un grupo diverso de genotipos de ají. El objetivo de este trabajo fue seleccionar un subgrupo de estos marcadores como herramienta de caracterización molecular para hacer posible la comparación de colecciones de germoplasma de *Capsicum* por grupos de investigación en cualquier parte del mundo.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Material vegetal

Este estudio incluyó 42 genotipos que representan 12 especies del género *Capsicum* (Tabla 1). El germoplasma fue obtenido de variedades comercialmente disponibles y de la Red de Información sobre Recursos de Germoplasma (GRIN, por su sigla en inglés) del USDA. Al menos tres semillas por accesión fueron puestas a germinar en invernadero bajo condiciones estándar (16 horas de luz y ocho horas de oscuridad con fertilización semanal) entre seis y ocho semanas, aproximadamente.

1.2 Extracción de ADN

Se colectaron hojas jóvenes y frescas para hacer la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Doyle & Doyle (1987). El tejido foliar de todos los individuos pertenecientes a un mismo genotipo se mezcló para extraer el ADN. La calidad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles al 1% de agarosa usando tampón TBE 0.5X (Tris borato EDTA) y tinción con bromuro de etidio. El gel fue expuesto a luz ultravioleta y fotografiado. Cada ADN fue diluido a una concentración final de 2.0 ng/μL y almacenado a -20°C hasta su uso.

1.3 Microsatélites (Repeticiones de secuencia simple o SSR)

Inicialmente se evaluaron 54 pares de cebadores de microsatélites. El número de fragmentos amplificados, el polimorfismo y la resolución de las bandas fueron los criterios empleados para elegir los 21 microsatélites que luego se utilizaron para evaluar la diversidad molecular de los 42 genotipos incluidos en el estudio (Tabla 2).

Los 15 SSR designados en la Tabla 2 como *Ng* fueron reportados por Nagy et al. (1998) y sus reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 15.0 μL que contenía 5.0 ng de ADN, 0.5 μM de cada cebador, 0.125 mM de cada dNTP, 1.5 μL de tampón 10X (0.1 M Tris pH 8.3, 0.5 M KCl, 7.5 mM MgCl_2 , 0.1% gelatina) y una unidad de *Taq* polimerasa. Los seis SSR de la Tabla 2 que están nombrados como *Bd* fueron reportados por Lee et al. (2004) y su amplificación se hizo en un volumen final de 10.0 μL con 6.0 ng de ADN, 0.3 μM de cada cebador, 0.1 mM de cada dNTP, 1.0 μL de tampón 10X (0.1 M Tris pH 8.3, 0.5 M KCl, 7.5 mM MgCl_2 , 0.1% gelatina) y una unidad de *Taq* polimerasa.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador programable PTC-225 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) utilizando las condiciones mostradas en la Tabla 2. Algunas amplificaciones se realizaron haciendo ciclos en cascada para disminuir la amplificación de productos no específicos (Don et al., 1991). Las reacciones de amplificación con ciclos en cascada empezaban en una temperatura de hibridación alta que iba disminuyendo en 1°C por cada ciclo hasta llegar a las respectivas temperaturas de hibridación de los cebadores (Tabla 2).

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en geles desnaturalizantes con poliacrilamida al 4% con 7 M de urea y tampón TBE 0.5X. A cada producto de la amplificación se le adicionó 6.0 μL de tampón [95% (v/v) formamida, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.05% (p/v) azul de bromofenol y xilen cianol FF], y luego se cargaron 5.0 μL de esta mezcla en los pozos del gel.

Las muestras se dejaron migrar (2000V, 75W, 50mA) e inmediatamente después se tiñeron con nitrato de plata. El tiempo de electroforesis para cada marcador se muestra en la Tabla 2. Después de la tinción con plata se observaron grupos discretos de dos a cinco bandas (lo que se suele llamar “tartamudeo”) en la mayoría de los marcadores. El “tartamudeo” se refiere a productos de la PCR que difieren en tamaño de la banda (alelo) principal haciendo que cada alelo (banda) observado en el gel parezca ser más de una banda (Litt et al., 1993).

Veintisiete muestras se añadieron en cada gel como control para evaluar la reproducibilidad de los patrones y comparar bandas entre geles. También se escogieron al azar 15 genotipos que se amplificaron separadamente y se corrieron varias veces en geles diferentes.

Para cada microsatélite se determinó el tamaño (medido en número de nucleótidos) de la banda amplificada más intensamente, con base en su migración relativa a la de los marcadores de peso molecular (escaleras de ADN de 50 pb y 10 pb, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).

1.4 Análisis de datos

Las bandas se registraron manualmente en estado presente (1) o ausente (0) y se generó una matriz de datos binarios. El contenido de información polimórfica (PIC), el cual representa la probabilidad de diferenciar dos genotipos con un SSR, se calculó como

$$PIC = 1 - \sum_i^n p_i^2 - 2 \sum_i^n p_i^2 q_j^2; \text{ donde } p_i \text{ y } q_j \text{ son las frecuencias relativas de los alelos } i\text{-ésimo y } j\text{-ésimo en un marcador dado, y } n \text{ es el número total de alelos detectados por el marcador.}$$

A partir de la matriz binaria se efectuó un análisis de similitud genética usando el coeficiente de Dice (Dice, 1945) $[2a/(2a + b + c)]$ para hacer todos los pares de comparaciones de genotipos; donde a es el número de bandas presentes simultáneamente en los dos genotipos, b es el número de bandas con presencia exclusiva en un genotipo, c es el número de bandas con presencia exclusiva del otro genotipo, y el factor *dos* permite diferenciar genotipos con niveles bajos de similitud. La ventaja que ofrece este coeficiente para el análisis de los datos es que cuenta el porcentaje de bandas compartidas entre dos genotipos, dándole más importancia a aquellas bandas presentes en ambos, y excluye las bandas ausentes en ambos genotipos, ya que éstas no necesariamente contribuyen a la similitud. Posteriormente se formaron grupos de individuos por su distancia mínima promedio con respecto al grupo empleando el método de la unión media (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973). El resultado de este análisis de conglomerados se representó en forma de dendrograma, utilizando la opción SAHN Clustering del paquete NTSYS-pc 2.02i para taxonomía numérica (Rohlf, 1998).

El anterior análisis de agrupación se complementó realizando un análisis de correspondencia múltiple (ACM) a partir de la matriz binaria. El ACM utiliza el patrón de bandas de cada genotipo para representar en un espacio métrico tridimensional las relaciones entre los individuos. La gráfica resultante muestra la ubicación de los individuos en el espacio, permitiendo apreciar su dispersión y la estructura poblacional de la muestra estudiada. Los cálculos se realizaron con el procedimiento Corresp. Anal. del paquete NTSYS-pc 2.02i para taxonomía numérica (Rohlf, 1998).

2. RESULTADOS

2.1 Polimorfismo detectado por los microsatélites

Se detectaron 208 alelos en los 21 loci evaluados. El promedio del número de alelos por locus fue 9.9, con un rango desde cinco (Ng20; Bd70) hasta 16 alelos (Ng17). La Tabla 3 presenta la descripción cualitativa de los 21 microsatélites según el número de alelos detectados. Los alelos de menor peso molecular (aprox. 82 pb) y de mayor peso molecular (aprox. 800 pb) fueron detectados por los microsatélites Bd22 y Ng15, respectivamente.

Los alelos que fueron observados solamente en uno o dos de los 42 genotipos evaluados (<5%) se consideraron alelos raros. Se registraron 102 alelos raros en 20 loci (Tabla 3). La cantidad de alelos por locus y el número de alelos raros mostraron una correlación lineal positiva significativa ($r = 0.90$; $P < 0.0001$). Los microsatélites Ng6 (78%) y Ng7 (73%) detectaron el mayor porcentaje de alelos raros.

La ausencia de amplificación para una combinación particular genotipo-marcador indicó la presencia de genotipos con alelos nulos en el locus en cuestión. Los alelos nulos son alelos que no son amplificados durante la PCR debido, tal vez, a polimorfismo en los sitios de hibridación de uno o ambos cebadores (Dakin & Avis, 2004). Los ensayos que detectaron alelos nulos se repitieron un mínimo de dos veces para asegurar que la ausencia de amplificación no se debía a un error experimental.

Trece de los 21 loci presentaron entre dos (5%) y 10 genotipos (24%) con alelos nulos (Tabla 3). Los dos genotipos de *C. rhomboideum* mostraron alelos nulos en estos 13 loci; además, estos genotipos fueron los únicos que exhibieron alelos nulos en siete (54%) de los 13 loci. A

pesar de la conocida prevalencia de los alelos nulos, su dinámica evolutiva y modelo de variación en las poblaciones no han sido examinados analíticamente; por lo tanto, actualmente se desconoce cuál es su verdadero impacto sobre la estimación de la diferenciación poblacional.

Cualquier combinación genotipo-marcador que produjera dos grupos de bandas sugería que el genotipo presentaba heterogeneidad (mezcla de alelos o alelos múltiples). El 62% de los loci evaluados detectaron genotipos con alelos múltiples. En promedio, para cada locus 1.6 genotipos presentaron alelos múltiples (Tabla 3). Los loci Ng4 (6), Ng7 (6) y Ng12 (5) presentaron la mayor cantidad de genotipos con alelos múltiples.

En promedio, en un locus determinado el alelo común fue compartido por el 31% de los genotipos evaluados (Tabla 3). La Tabla 3 muestra que hubo una variación considerable en la frecuencia del alelo más común. El número de alelos por locus y la frecuencia del alelo más común en el locus estuvieron negativamente correlacionados ($r = -0.66$, $P = 0.0011$).

El nivel de polimorfismo entre los 42 genotipos se evaluó calculando el contenido de información polimórfica (PIC) para cada loci. Los valores del PIC estuvieron entre 0.546 (Ng20) y 0.906 (Ng18), con un promedio de 0.788 por marcador. Estos valores mostraron una correlación lineal positiva significativa con el número de alelos ($r = 0.77$; $P < 0.0001$) y una correlación baja con el rango del tamaño de los alelos ($r = 0.13$; $P = 0.5835$), indicando que los microsatélites que detectaron más alelos fueron los más informativos, sin importar las diferencias de tamaño entre los alelos que revelaron.

2.2 Similitud genética entre los genotipos

Los 21 SSR usados en el estudio permitieron distinguir los 42 genotipos evaluados. Por otro lado, el análisis de las relaciones genéticas entre todos los genotipos sugirió la existencia de siete grupos principales que reúnen a 33 de los genotipos evaluados (Figura 1). Al truncar el dendrograma en el 50% de similitud, los conglomerados corresponden principalmente a: A) *C. annuum*, B) *C. chinense*, C) *C. chinense-C. frutescens*, D) *C. baccatum*, E) *C. chacoense*, F) *C. pubescens* y G) *C. rhomboideum* (Figura 1).

Asimismo, en este nivel de similitud se observa que tres genotipos (*8ann*, *10chixann* y *28lut*) conformaron un conglomerado menor que queda incluido en el grupo A al 48% de similitud. Además, se observan seis grupos unitarios conformados por los genotipos de la especies cultivadas *C. baccatum* (*56bac* y *20bac*) y *C. frutescens* (*16fru*), y de las especies silvestres *C. minutiflorum* (*23min*), *C. cardenasii* (*24car*) y *C. flexuosum* (*25fle*).

Los dos genotipos de *C. rhomboideum* mostraron niveles de similitud cercanos a cero con el resto de genotipos (grupo G). Esta especie presenta una combinación de características morfológicas que contrasta con las otras especies del género *Capsicum*; sus flores son amarillas, a diferencia de las otras especies cuyas flores son color blanco o púrpura y su sabor nunca es picante, debido a que carece de capsicina (D'Arcy & Eshbaugh, 1974).

El grupo A reunió nueve genotipos de *C. annuum* y uno de *C. abbreviatum*. El grupo B lo conformaron cuatro genotipos de *C. chinense*. El grupo C contuvo tres genotipos de *C. chinense* y tres de *C. frutescens*. El grupo D lo conformaron dos genotipos de *C. baccatum*, uno de *C. baccatum* var. *baccatum*, tres de *C. baccatum* var. *pendulum* y un genotipo de *C.*

frutescens. Los dos genotipos de *C. chacoense* conformaron el grupo E. El grupo F quedó constituido por el par de genotipos de *C. pubescens*.

Análisis de correspondencia múltiple (ACM) — El procedimiento de conglomerados aplicado sobre las coordenadas obtenidas a través del ACM indicó una estructura de grupos dentro de los genotipos analizados. La segunda dimensión permitió la separación de los dos genotipos de *C. rhomboideum* (grupo G) del resto de genotipos incluidos en el estudio. Las otras dos dimensiones discriminaron los otros 40 genotipos en grupos, de acuerdo con su especie taxonómica (Figura 2). Los grupos formados por el ACM concordaron con los grupos obtenidos en el análisis de conglomerados realizado usando el índice de similitud de Dice (Dice, 1945) (Figura 1).

2.3 Marcadores para distinguir entre los genotipos de la misma especie

Debido a su polimorfismo, 15 SSR fueron útiles para diferenciar los 10 genotipos de *C. annuum* (Tabla 4). Ninguno de estos marcadores detectó alelos nulos en este grupo de genotipos. El genotipo *C. annuum* var. chung yang mostró alelos múltiples en los loci Ng4, Ng15, Bd22 y Bd70 (datos no mostrados). Los genotipos Jalapeño 3575, Jalapeño 1493 y PapriQueen presentaron alelos múltiples en los sistemas Ng4, Ng9 y Ng15, respectivamente (datos no mostrados).

Veinte microsatélites revelaron polimorfismo dentro de los genotipos de *C. baccatum* (Tabla 4). Los valores del PIC indicaron que los loci Ng7 y Ng34 fueron los más informativos en los genotipos de esta especie. El genotipo *51bacpen* mostró alelos nulos en el locus Ng5. Los loci revelados por los microsatélites Ng34 (*16bac* y *60bac*) y Bd41 (*16bac*, *37bacbac*, *43bacpen*,

49bacpen, *51bacpen* y *60bac*) detectaron genotipos con alelos nulos (datos no mostrados). El genotipo *C. baccatum* var. *praetermesum* mostró alelos múltiples en los loci detectados por los microsatélites Ng12, Bd12 y Bd22. El microsatélite Ng15 detectó alelos múltiples en el genotipo *56bac*.

Los siete genotipos de *C. chinense* fueron polimórficos en 20 loci (Tabla 4). Solamente se detectaron alelos nulos para el genotipo *14chi* (locus Ng34). Los genotipos *12chi* y *53chi* mostraron alelos múltiples en el locus Ng4. Los valores del PIC indicaron que los loci detectados por los microsatélites Ng7, Ng33 y Ng34 fueron los más informativos.

Los genotipos de *C. frutescens* fueron polimórficos en los loci detectados por los 21 microsatélites evaluados (Tabla 4). Se observaron tres genotipos con alelos nulos en el locus detectado por el microsatélite Ng34 (*58fru*, *59fru* y *61fru*) y otro genotipo en el locus Bd41 (*59fru*). El microsatélite Ng5 detectó un genotipo con alelos múltiples (*15fru*). Los valores del PIC indicaron que el microsatélite Ng8 fue el más informativo; este microsatélite detectó un alelo distinto para cada genotipo evaluado. Los microsatélites Ng17, Ng18, Bd22 y Bd33 presentaron el mismo nivel informativo.

3. DISCUSIÓN

3.1 Polimorfismo molecular

Los microsatélites presentan algunas ventajas sobre otros tipos de marcadores moleculares, tales como los RFLP, RAPD y AFLP. Una de estas ventajas es su multi-alelismo (de Vicente & Fulton, 2003). Los 21 microsatélites usados en este trabajo permitieron observar un total de 208 alelos, con un número promedio de alelos por locus de 9.9. La correlación lineal positiva significativa ($r = 0.77$; $P < 0.0001$) del valor del PIC con el número de alelos por SSR indica que los marcadores que detectaron más alelos serían mejores para hacer genotipificación y análisis de diversidad. Esta correlación significa que cualquiera de estos dos estimadores es útil para determinar el valor de un marcador en estudios de diversidad. El promedio del valor del PIC de este trabajo fue similar al promedio reportado para trigo (0.71) y *Brassica rapa* (0.71) (Prasad et al., 2000; Suwabe et al., 2002).

Los alelos raros son altamente informativos para la genotipificación de variedades (Jain et al., 2004). Ellos pueden ser indicadores de la presencia de variantes genéticas únicas o de poblaciones diferenciadas. Por otro lado, la deriva genética conduce rápidamente a la pérdida de estos alelos. Sin embargo, esta susceptibilidad a sufrir los efectos de la deriva genética convierte a los alelos raros en un instrumento útil para la evaluación de la erosión genética que ocurre durante el manejo de las colecciones de germoplasma. Por lo tanto, varios de los microsatélites evaluados en este estudio podrían ser útiles en la identificación eficaz de variedades o especies del género *Capsicum*, debido a que detectaron alelos raros; además, ayudarían en la toma de decisiones sobre la forma más eficiente de propagar y mantener colecciones *ex situ* de germoplasma de *Capsicum*.

El nivel de polimorfismo de los 21 microsatélites, evaluado a través de los valores del PIC, fue muy alto (valor promedio = 0.788; rango desde 0.546 a 0.906). Lo anterior significa que el polimorfismo de estos marcadores microsatélite sería útil para descubrir entradas duplicadas en las colecciones *ex situ* de germoplasma de *Capsicum* y en la resolución de disputas relacionadas con la propiedad de semillas. Asimismo, los altos valores informativos y la capacidad de distinguir los genotipos empleados en el estudio, como lo muestran el análisis de conglomerados y el ACM, refuerzan la utilidad potencial que tendrían estos microsatélites para ayudar a diferenciar especies o variedades del género *Capsicum*.

Más del 60% de los microsatélites evaluados detectaron genotipos con alelos múltiples (Tabla 3). Este polimorfismo podría ser: i) el resultado de una heterocigosidad remanente en algunos genotipos o ii) el producto de la heterogeneidad producida por la mezcla involuntaria de semilla. La heterocigosidad residual podría ser el resultado de alogamia y sería una característica previsible en materiales que no hayan sido mejorados para obtener líneas puras. *Capsicum* es considerado como un cultivo que se reproduce por autopolinización (Allard, 1971). Sin embargo, las tasas de alogamia que presenta sugieren que debería ser considerado una planta con fecundación por polinización cruzada facultativa (Tanksley, 1984). En este trabajo, la heterocigosidad no puede distinguirse claramente de la heterogeneidad, debido a que el tejido vegetal de tres muestras se mezcló para extraer el ADN. Sin embargo, la presencia de variantes alélicas tiene gran valor para encontrar marcadores propios de un genotipo.

La mayoría de los genotipos evaluados en este estudio (genotipos 1 al 30) han sido multiplicados por autopolinización en los invernaderos de Cornell University (grupo de

trabajo de la Dra. Molly Jahn) durante varios años para obtener semillas que se usan en los programas de mejoramiento. Aunque no se pueden descartar los errores involuntarios durante la manipulación, lo anterior permitiría asumir una probabilidad baja de que hayan ocurrido mezclas de semilla durante el manejo de estos genotipos; en consecuencia, los alelos múltiples detectados en algunos genotipos manejados en Cornell University (p.e., Jalapeño 3575, Jalapeño 1493, PapriQueen y Praetermisum) sugieren que los microsatélites evaluados en este trabajo serían útiles para descubrir nueva variabilidad o variantes alélicas que puedan usarse como marcadores propios de un genotipo.

Los genotipos restantes fueron obtenidos del USDA (genotipos 31 al 42); sin embargo, se desconoce de qué forma se han manipulado estos materiales durante su conservación en esta institución. Esto significa que los genotipos con alelos múltiples de este subconjunto (p.e.; *53chi*, *54chi* y *55chi*) tal vez están indicando que hubo mezcla involuntaria de semilla durante el manejo del germoplasma o algún error en la asignación del número de introducción (PI) en el banco de germoplasma del cual se obtuvieron inicialmente los genotipos. Por lo tanto, este estudio presenta varios marcadores que se podrían utilizar en los bancos de germoplasma como una herramienta para detectar errores inconscientes que se cometen durante el manejo del germoplasma.

3.2 Fomento del uso y conservación de los recursos fitogenéticos

La conservación de los recursos genéticos se justifica fomentando la utilización de las colecciones *ex situ*; sin embargo, el cumplimiento de este objetivo se dificulta debido a que los investigadores de los sectores privado y público tienen necesidades diferentes. Además, los procedimientos experimentales para encontrar marcadores polimórficos pueden variar entre

laboratorios y la comparación de los datos puede ser problemática. Por lo tanto, la cooperación entre los bancos de germoplasma es indispensable para alcanzar la máxima eficiencia en el manejo de los recursos genéticos. Tal cooperación implica el intercambio de metodologías y tecnologías para investigar, documentar, manejar y utilizar los recursos genéticos. Debido a que la diversidad genética de las especies conservadas *ex situ* está distribuida en los bancos de germoplasma, la comparación de diferentes colecciones es importante para determinar cuánta diversidad de un cultivo está siendo conservada y cómo está distribuida entre distintos bancos.

Este trabajo presenta un grupo de marcadores microsatélites que son útiles en la evaluación de la diversidad genética del género *Capsicum*. Debido a su polimorfismo, estos microsatélites pueden usarse para evaluar cambios en la estructura genética de las colecciones *ex situ* de germoplasma de *Capsicum*. Obtener información cuantitativa sobre las frecuencias alélicas serviría como punto de partida para tomar decisiones adecuadas en la conservación de germoplasma de *Capsicum* con variantes alélicas de frecuencia baja, en la genotipificación de variedades, en la búsqueda de fuentes de diversidad genética y para analizar la historia reciente de una variedad comercial o del germoplasma propio de un área geográfica.

Usar estos marcadores para adquirir conocimiento sobre las colecciones de *Capsicum* permitirá incrementar el uso del germoplasma *ex situ* empleado en el desarrollo de variedades mejoradas que se adapten con éxito a diferentes condiciones ambientales y que presenten tolerancia a las plagas y niveles superiores de productividad. Adicionalmente, el conocimiento obtenido servirá para establecer modelos y prioridades en los métodos de conservación de los recursos genéticos a través de la identificación de vacíos y de la evaluación de la representatividad de las colecciones *ex situ*.

Esta es la primera vez que los marcadores microsatélite son usados para evaluar simultáneamente la diversidad genética de 12 especies del género *Capsicum*. Por lo tanto, el presente trabajo es un punto de partida para la escogencia de marcadores microsatélite que puedan usarse en la caracterización de germoplasma de *Capsicum* y en la selección asistida por marcadores. Asimismo, este estudio puede ser tomado como la base de futuros trabajos que incluyan más especies y más entradas por especie, con el fin de encontrar más marcadores que permitan tener un conocimiento amplio de la diversidad genética del género *Capsicum*.

4. LITERATURA CITADA

- ALLARD, R.W. 1971. Princípios do melhoramento genético das plantas. Edgard Blucher, São Paulo.
- ANDREWS, J. 1996. Chili or chile is silly, when it should be chilli: why I call pungent Capsicums chilies (*Capsicum*). Pag. 8 *en* Proceedings of the national pepper conference. Alexandria, VA: American Society for Horticultural Science.
- BOSLAND, P.W. 1994. Chiles: history, cultivation, and uses. Pag. 347-366 *en* Spices, herbs, and edible fungi (G. Charalambous, ed.). Elsevier Publ., New York.
- BOSLAND, P.W. 1999. Chiles: a gift from fiery god. HortScience 34:809-811.
- BOSLAND, P.W. & M.M. GONZÁLEZ. 2000. The rediscovery of *Capsicum lanceolatum* (Solanaceae), and the importance of nature reserves in preserving cryptic biodiversity. Biodivers. and Conserv. 9:1391-1397.
- CIPRIANI, G., M.T. MARRAZZO, R. MARCONI, A. CIMATO & R. TESTOLIN. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. Theor. Appl. Genet. 104:223-228.
- DAKIN, E.E. & J.C. AVIS. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93:504-509.
- D'ARCY, W.G. & W.H. ESHBAUGH. 1974. New world peppers (*Capsicum*-Solanaceae) north of Colombia: a resume. Baileya 19:93-105.
- DEAN, R.E., J.A. DAHLBERG, M.S. HOPKINS, S.E. MITCHELL & S. KRESOVICH. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. national

sorghum collection as assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *Crop Sci.* 39:1215-1221.

DETTORI, M.T., R. QUARTA & I. VERDE. 2001. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs and morphological markers. *Genome* 44:783–790.

DICE, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26:297-302.

DON, R.H., P.T. COX, B.J. WAINWRIGHT, K. BAKER & J.S. MATTICK. 1991. ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.

DOYLE, J.J. & J.L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull.* 19:11-15.

ESHBAUGH, W.H. 1993. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. Pag. 132-139 *en* *New Crops* (J. Janick & J.E. Simon, eds.). Wiley, New York.

HAYWARD, M.D. & N.R. SACKVILLE HAMILTON. 1997. Genetic diversity population structure and conservation. Pag. 49-76 *en* *Biotechnology and Plant Genetic Resources* (J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd & H.J. Newbury, eds.). CAB International, Wallingford, UK.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. 1983. Genetic resources of *Capsicum*. IBPGR, Rome.

JAIN, S., R.K. JAIN & S. MCCOUCH. 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:965-977.

KNUDSEN, H. 2000. Directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Roma, Italia.

- LEE, J.M., S.H. NAHM, Y.M. KIM & B.D. KIM. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108:619-627.
- LITT, M., X. HAUGE & V. SHARMA. 1993. Shadow bands seen when typing polymorphic repeats: some causes and cures. *BioTechniques* 15:280-284.
- MATHUR, R., R.S. DANGI, S.C. DASS & R.C. MALHOTRA. 2000. The hottest chili in India. *Curr. Sci.* 79:287-288.
- MATSUOKA, Y., S.E. MITCHELL, S. KRESOVICH, M. GOODMAN & J. DOEBLEY. 2002. Microsatellites in *Zea* - variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104:436-450.
- NAGY, I., A. POLLEY & M. GANAL. 1998. Development and characterization of microsatellite markers in pepper. Pag. 235-237 *en* Xth Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant.
- PRASAD, M., R.K. VARSHNEY, J.K. ROY, H.S. BALYAN & P.K. GUPTA. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:584-592.
- ROHLF, F.J. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis: version 2.02i. *Appl. Biostat.* New York.
- ROSERO-GALINDO, C., E. GAITÁN-SOLÍS, H. CÁRDENAS-HENAO, J. TOHME & N. TORO-PEREA. 2002. Polymorphic microsatellites in a mangrove species, *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). *Mol. Ecol. Notes* 2:281-283.
- SIWACH, P., S. JAIN, N. SAINI, V.K. CHOWDHURY & R.K. JAIN. 2004. Allelic diversity among Basmati and Non-Basmati long-grain *Indica* rice varieties using microsatellite markers. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 13:25-32.

- SNEATH, P.H.A. & R.R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco. Theor. Appl. Genet. 93:613-617.
- SONG, Z., B.R. LU, Y.G. ZHU & J.K. CHEN. 2003. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. New Phytol. 157:657-665.
- SUWABE, K., H. IKETANI, T. NUNOME, T. KAGE & M. HIRAI. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. Theor. Appl. Genet. 104:1092-1098.
- TANKSLEY, S.D. 1984. High rates of cross-pollination in chile pepper. HortScience 19:580-582.
- de VICENTE, M.C. 2002. Molecular techniques to facilitate prioritization of plant genetic resources conservation and further research. AgBiotechNet.4 ABN 092.
- de VICENTE, M.C. & T. FULTON (eds.). 2003. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity studies: learning module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.
- WALSH, B.M. & S.B. HOOT. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. Int. J. Plant Sci. 162(6):1409-1418.

Tabla 1. Lista de los genotipos usados en este estudio. Las columnas presentan la especie botánica, la abreviatura usada en los análisis de datos, el grupo resultante del análisis de conglomerados, el nombre del genotipo o el número de la entrada y el grado de picante.

	Especie	Abreviatura	Grupo	Genotipo/Entrada	Picante
1	<i>C. annuum</i>	1ann	A	Maor [†]	Dulce
2	<i>C. annuum</i>	2ann	A	Jupiter [†]	Dulce
3	<i>C. annuum</i>	3ann	A	Jalapeño 3575 [†]	Dulce
4	<i>C. annuum</i>	4ann	A	Jalapeño 1493 [†]	Picante
5	<i>C. annuum</i>	5ann	A	Jalapeño M [†]	Picante
6	<i>C. annuum</i>	6ann	A	RNaky [†]	Picante
7	<i>C. annuum</i>	7ann	A	PapriQueen [†]	
8	<i>C. annuum</i>	8ann		Thai hot [†]	Picante
9	<i>C. annuum</i>	9ann	A	Chung yan [†]	Picante
10	<i>chinense x annuum</i>	10chixann		Bahamian Superhot [†]	Picante
11	<i>C. chinense</i>	11chi	B	Habanero 11 [†]	Picante
12	<i>C. chinense</i>	12chi	B	Peach Savina [†]	
13	<i>C. chinense</i>	13chi	B	NMCA30036	Dulce
14	<i>C. chinense</i>	14chi	B	PI159234	
15	<i>C. frutescens</i>	15fru	C	Tabasco [†]	Picante
16	<i>C. frutescens</i>	16fru		2814-6-2	Picante
17	<i>C. annuum</i>	17ann	A	Cayenne [†]	Picante
18	<i>C. chacoense</i>	18cha	E	PI439414	

[†] Variedad comercial

Continuación de la Tabla 1.

	Especie	Abreviatura	Grupo	Genotipo/Entrada	Picante
19	<i>C. chacoense</i>	19cha	E	PI555612	
20	<i>C. baccatum</i>	20bac		Praetermesum	
21	<i>C. pubescens</i>	21pub	E	80062	Picante (bajo)
22	<i>C. pubescens</i>	22pub	E	PI158277	Dulce (picante muy bajo)
23	<i>C. minutiflorum</i>	23min	E	Silvestre	Picante
24	<i>C. cardenasii</i>	24car	E	Silvestre	
25	<i>C. flexuosum</i>	25flex	E	Silvestre	Dulce
26	<i>C. rhomboideum</i>	26cil	F	Silvestre	Dulce
27	<i>C. rhomboideum</i>	27cil	F	Silvestre	Dulce
28	<i>C. abbreviatum</i>	1abb	A	PI93475011B-03-3	
29	<i>C. baccatum</i>	16bac	D	NMCA 20016A	
30	<i>C. luteum</i>	28lut		PI979750065A-03-1	
31	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	37bacbac	D	PI260567-3-26	
32	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	43bacpen	D	PI241679C-mm02-28	
33	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	49bacpen	D	PI24167919-02-47	
34	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	51bacpen	D	PI337522B-mm-02-34	
35	<i>C. chinense</i>	53chi	C	PI281421B-03-9	
36	<i>C. chinense</i>	54chi	C	PI281421B-03-9-A	
37	<i>C. chinense</i>	55chi	C	PI281421B-03-9-B	

Continuación de la Tabla 1.

	Especie	Abreviatura	Grupo	Genotipo/Entrada	Picante
38	<i>C. baccatum</i>	56bac		PI439378A-mm02-36	
39	<i>C. frutescens</i>	58fru	C	PI441648A-0242	
40	<i>C. frutescens</i>	59fru	D	PI441648A-0242-A	
41	<i>C. baccatum</i>	60bac	D	PI439381A-mm02-39	
42	<i>C. frutescens</i>	61 fru	C	PI446908A-03-17	

Tabla 2. Condiciones de amplificación y electroforesis para los 21 SSR evaluados. TE: tiempo de electroforesis en minutos.

SSR	Locus	Repetición	Cebador		PCR*	TE (min)
			Adelantado	Retrasado		
Ng4	CA515275	(TC) ₄ (CT) ₁₃	ctctgccctcctcaacc	Aaaatatggcggagatccg	55, 35	40
Ng5	BM067271	(CTG) ₆	gtatgctgcaaccatcggtg	Attggttgggagacacagc	55, 35	75
Ng6	CA515649	(CAT) ₆	tctccaatttcattcgag	Taatgcatttgcgaactg	55, 35	60
Ng7	CA525390	(CT) ₁₄ (CA) ₉ GA(CA) ₄ GA(CA) ₄	ggaaactaaacacactttctctc	Actggacgccagttgatc	55, 35	50
Ng8	CA516044		atctttctcatttctccttc	Tgctcagcattaacgacgctc	55, 35	45
Ng9	BM061910	T ₁₆	attgtgatagcaaccctgg	Cacagatgagggcacaaatg	55, 35	70
Ng10	CA516334	(CAA) ₆	accaccttcatcaacaacc	Attgtggcttttcgaaacg	55, 35	70
Ng12	BM064867	(CAT) ₆	tctgggaattttggaactgc	Tccagtttgatcatctccaac	55, 29 ^a	50
Ng15	CA515055	(CAT) ₂ ...(CAT) ₆	taatcgagcggtagattcgg	Taagtggaggtgccctctg	55, 35	90
Ng17	GPMS 93		atccttggcgtattttgcac	Ttactttgcacacaggctt	55, 35	90
Ng18	CA517699	(CA) ₁₅	acgccaagaaaatcatctcc	Ccattgctgaagaaaatggg	55, 29 ^a	40
Ng20	BM061461	(GA) ₉	ctcattaccacttcatacaaaacag	Tgcagtaggtgtgctacgg	55, 35	60
Ng33	CA516439		gacagtctttcaagaactagagagag	Tggagcaaacacagcagaac	55, 35	50
Ng34	GPMS 117		gatgttaggtccgtgcttcg	Aagcccatggaagtatcc	55, 29 ^a	45
Ng35	GPMS 187		tttagaatcctcaccacggg	Tcaatgcacaaactttaattgc	55, 29 ^a	60
Bd12	Hpms1-139	(CT) ₂ (AG) ₁₅	ccaacagtaggacccgaaaatcc	atgaaggctactgctgcatcc	58, 29 ^b	80
Bd17	Hpms1-165	(GA) ₁₃	ggctatttccgacaaaacctcag	ccattggtgtttcactgtgtg	54, 35	60
Bd22	Hpms1-214	(GTTT) ₂ (TTG) ₉	tgcgagtaccgagttcttctag	ggcagtcctgggacaactcg	58, 35	40

Continuación de la Tabla 2.

SSR	Locus	Repetición	Cebador		PCR*	TE (min)
			Adelantado	Retrasado		
Bd33	<i>Hpms2-23</i>	(AT) ₁₁ (AC) ₉ (ATAC) ₁₀	ccctcggctcaggataaatacc	ccccagactcccactttgtg	57, 35	40
Bd41	<i>HpmsCaSIG</i>	(CT) ₆ (AT) ₈ (GTAT) ₅	catgaatttcgtcttgaaggctcc	aagggtgtatcgtacgcagcctta	58, 29 ^b	60
Bd70	<i>CM0005</i>	(CCA) ₈	catgaccacatgaggata	gatagccacgagcatagtatt	54, 29 ^c	50

* Condiciones de la PCR: Temperatura de hibridación (°C) y número de ciclos, respectivamente; ^a PCR en cascada: 63°C –1°C/ciclo;

^b PCR en cascada: 65°C –1°C/ciclo; ^c PCR en cascada: 62°C –1°C/ciclo

Tabla 3. Datos sobre el número de alelos, número de alelos raros, número de genotipos con alelos raros y múltiples, rango del tamaño alélico, frecuencia alélica más alta y contenido informativo polimórfico (PIC) observados en los 42 genotipos de *Capsicum* para los 21 microsatélites. **Crom.:** cromosoma. **Dif.:** diferencia.

SSR	Crom.	Alelos	Alelos raros	Genotipos con:		Rango del tamaño (pb)	Dif. (pb)	Alelo común		PIC
				Alelos nulos	Alelos múltiples			Tamaño (pb)	Frecuencia (%)	
Ng4	12	10	4	0	6	89 – 114	25	98	29.8	0.798
Ng5	8	7	3	2	2	300 – 324	24	312	35.7	0.761
Ng6	2	9	7	0	0	183 – 201	18	192	42.9	0.696
Ng7	7	15	11	0	6	143 – 193	50	176	33.3	0.817
Ng8	6	9	2	2	1	186 – 218	32	197	23.8	0.852
Ng9	3	6	2	0	1	242 – 327	85	297	51.2	0.638
Ng10	6	9	4	2	1	236 – 277	41	245	36.9	0.782
Ng12	2	14	10	2	5	128 – 190	62	136	31.0	0.810
Ng15	2	9	4	0	4	338 – 800	462	355	27.4	0.787
Ng17	3	16	10	0	1	200 – 422	222	248	16.7	0.899
Ng18	3	14	7	5	0	123 – 146	23	132	16.7	0.906
Ng20	4	5	2	2	0	196 – 217	21	212	61.9	0.546
Ng33	10	9	4	2	0	136 – 154	18	149	35.7	0.797
Ng34	5	9	4	7	0	106 – 162	56	142	23.8	0.804
Ng35	6	7	3	3	0	226 – 250	24	242	40.5	0.729
Bd12	1	11	3	2	1	268 – 344	76	296, 300, 307	14.3	0.879
Bd17	17	12	6	0	0	196 – 235	39	203	26.2	0.840
Bd22	1	12	6	7	2	82 – 104	22	94	19.1	0.867
Bd33	5	8	3	3	0	110 – 125	15	125	31.0	0.800

Continuación de la Tabla 3.

SSR	Crom.	Alelos	Alelos raros	Genotipos con:		Rango del tamaño (pb)	Dif. (pb)	Alelo común		PIC
				Alelos nulos	Alelos múltiples			Tamaño (pb)	Frecuencia (%)	
Bd41	7	12	7	10	1	190 – 231	41	208	21.4	0.833
Bd70		5	0	0	2	150 – 165	15	154	32.1	0.715
Total		208	102							
Media		9.9	4.86	2.3	1.6		65		31.0	0.788

Tabla 4. Número de alelos y valores del contenido informativo polimórfico (PIC) observados en los 21 microsatélites dentro de los genotipos de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens*. n: número de genotipos por especie.

SSR	<i>C. annuum</i>		<i>C. baccatum</i>		<i>C. chinense</i>		<i>C. frutescens</i>	
	n = 10		n = 8		n = 7		n = 5	
	Alelos	PIC	Alelos	PIC	Alelos	PIC	Alelos	PIC
Ng4	3	0.442	2	0.195	3	0.523	3	0.499
Ng5	1	0.000	3	0.605	2	0.370	4	0.610
Ng6	1	0.000	2	0.219	2	0.490	2	0.320
Ng7	3	0.314	5	0.712	5	0.700	2	0.269
Ng8	4	0.596	2	0.195	2	0.325	5	0.768
Ng9	2	0.351	1	0.000	2	0.370	2	0.269
Ng10	4	0.450	3	0.371	2	0.370	2	0.269
Ng12	1	0.000	4	0.547	1	0.000	4	0.672
Ng15	3	0.572	5	0.618	2	0.370	3	0.499
Ng17	2	0.375	4	0.630	3	0.530	3	0.672
Ng18	4	0.692	4	0.605	3	0.530	4	0.672
Ng20	1	0.000	2	0.195	3	0.530	3	0.499
Ng33	3	0.548	4	0.524	4	0.641	2	0.269
Ng34	5	0.642	4	0.712	3	0.641	2	0.499
Ng35	1	0.000	2	0.195	3	0.406	3	0.563
Bd12	2	0.375	4	0.483	3	0.530	3	0.499
Bd17	2	0.164	3	0.555	2	0.370	3	0.563
Bd22	5	0.716	4	0.510	3	0.530	4	0.672
Bd33	1	0.000	2	0.195	2	0.370	3	0.672
Bd41	3	0.410	2	0.371	2	0.215	2	0.499
Bd70	3	0.347	2	0.195	2	0.370	3	0.499
Total	54		64		54		62	
Media	2.57	0.333	3.05	0.411	2.57	0.437	2.95	0.512

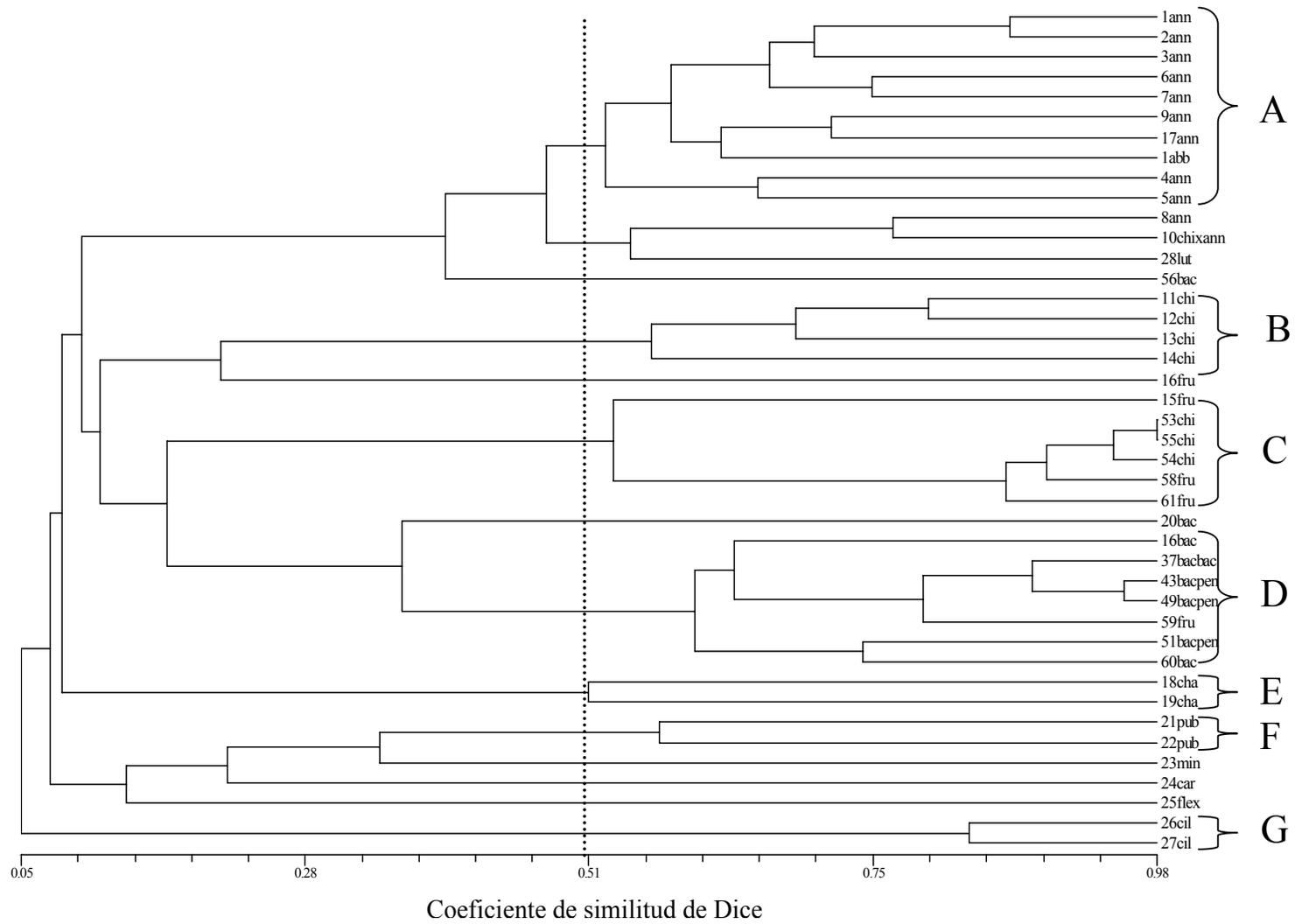


Figura 1. Relaciones genéticas de los 42 genotipos evaluados, obtenidas con los 208 alelos de los 21 SSR usando el coeficiente de similitud de Dice y el método UPGMA.

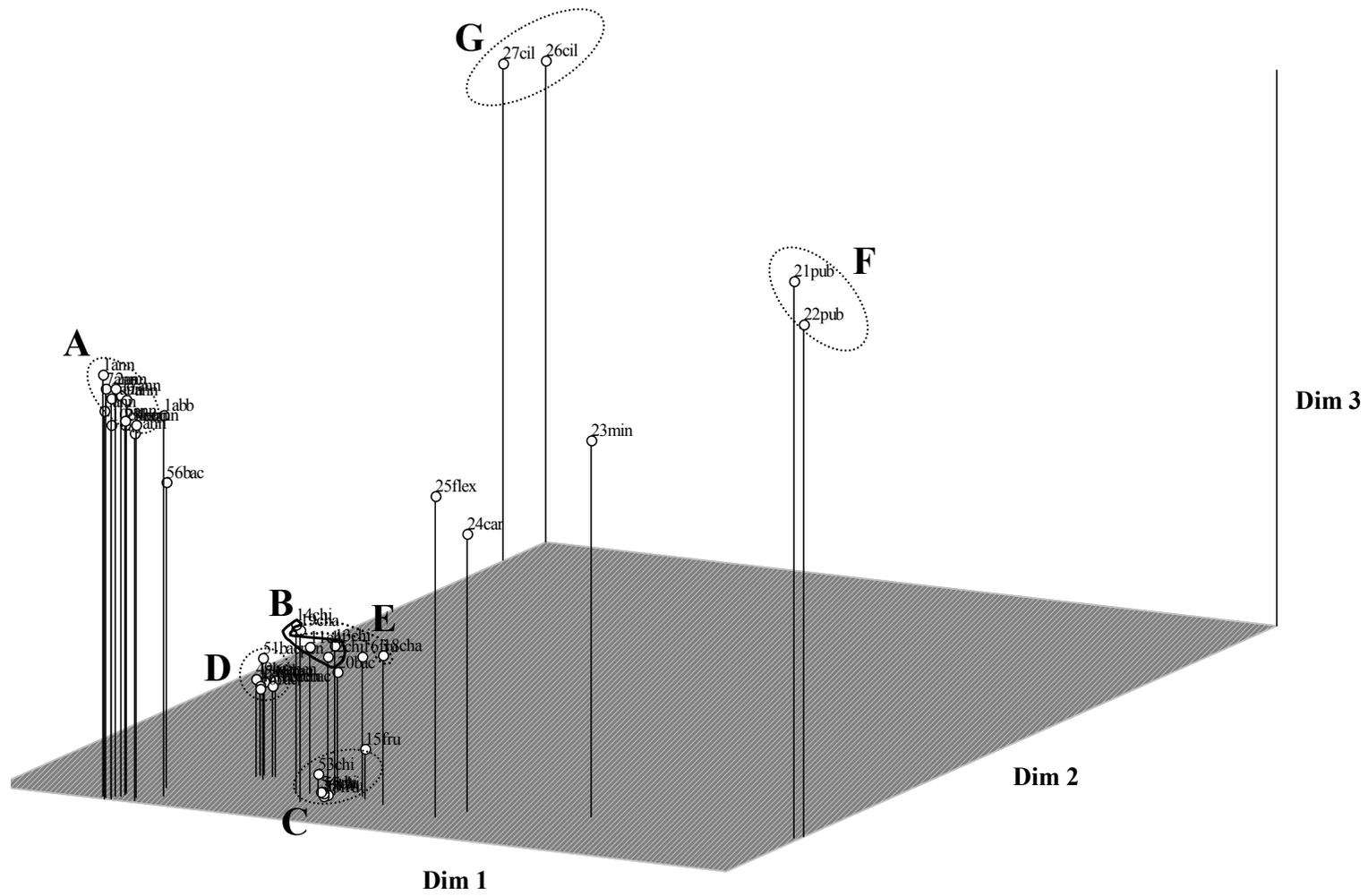


Figura 2. Distribución espacial de los grupos de genotipos, obtenida con el análisis de correspondencia múltiple.