DIVERSIDAD GENÉTICA DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) MEDIANTE ISSR

GENETIC DIVERSITY OF HABANERO PEPPER (*Capsicum chinense* Jacq.) USING ISSR

S. Teresa López-Espinosa[1], Luis Latournerie-Moreno[1]*, Guillermo Castañón-Nájera[2], Esaú Ruiz-Sánchez[1], Juan F. Gómez-Leyva[3], Rubén H. Andueza-Noh[1] y Javier O. Mijangos-Cortés[4]

[1]Tecnológico Nacional de México / IT Conkal. Av. Tecnológico s/n. 97345, Conkal, Yucatán, México. [2]División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. km 0.5 Carr. Villahermosa-Cárdenas entronque Bosques de Saloya. 86139, Villahermosa, Tabasco, México. [3]Tecnológico Nacional de México / IT Tlajomulco. km 10 Carretera Tlajomulco-San Miguel de Cuyutlán. 45640, Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco. [4]Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 × 32 y 34, Chuburná de Hidalgo. 97205, Mérida, Yucatán, México.

**Autor para correspondencia* (luis.latournerie@itconkal.edu.mx)

RESUMEN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es distintivo de la Península de Yucatán, México; sin embargo, los estudios de diversidad genética a nivel molecular en este cultivo son escasos. El presente trabajo se planteó con el objetivo de caracterizar la diversidad genética del germoplasma de chile habanero, mediante marcadores ISSR. El material genético consistió en 60 poblaciones criollas de chile habanero recolectadas en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Tabasco, México, las cuales fueron genéticamente analizadas con tres loci ISSRs. El ADN fue extraído por el método de CTAB y los fragmentos se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los datos se analizaron con los programas POPGENE V 1.31 y NTSYS V 2.0 mediante un análisis de componentes principales y las relaciones entre las poblaciones se obtuvieron con un análisis jerárquico de conglomerados usando el método UPGMA. Se detectaron un total 32 bandas y 98 % de ellas fueron polimórficas. Los resultados indican que la diversidad genética en poblaciones de chile habanero es alta, en donde el 95.5 % de la variación observada se encuentra dentro de las poblaciones y sólo el 4.5 % entre ellas. Se detectó un alto flujo génico entre las poblaciones. Los resultados de los análisis multivariados sugieren que gran cantidad de germoplasma de chile habanero se ha dispersado del estado de Yucatán a los estados de Campeche, Quintana Roo y Tabasco. El patrón de distribución de la diversidad genética de chile habanero no se asoció con el lugar de origen de las poblaciones analizadas.

Palabras clave: *Capsicum chinense*, diversidad genética, caracterización molecular, marcadores ISSR.

SUMMARY

Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) is distinctive of the Yucatan Peninsula, Mexico; however, studies of genetic diversity at the molecular level on this crop are scarce. The present study was proposed with the objective of characterizeing the genetic diversity of habanero pepper germplasm by using ISSR markers. The genetic material consisted of 60 landrace populations of habanero pepper collected in the states of Yucatan, Campeche, Quintana Roo and Tabasco, Mexico, which were genetically analyzed with three ISSR loci. DNA was extracted by the CTAB method, and the fragments were amplified through the polymerase chain reaction (PCR). Data were analyzed using the POPGENE V 1.31 and NTSYS V 2.0 programs by means of principal component analysis, and the genetic relationships among populations were obtained by hierarchical cluster analysis based on the UPGMA method. A total of 32 bands were detected and 98 % of them were polymorphic. Results indicate that genetic diversity in habanero pepper is large, 95.5 % of the observed variation occurred within the populations and only 4.5 % among them. A high gene flow was detected among populations. Results of multivariate analyses suggest that a large amount habanero pepper germplasm has dispersed from the state of Yucatan to the states of Campeche, Quintana Roo and Tabasco. The distribution pattern of genetic diversity of habanero pepper populations was not associated to the provenance of the analyzed populations.

Index words: *Capsicum chinense*, genetic diversity, molecular characterization, ISSR markers.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* lo integran alrededor de 35 especies, dentro de las cuales las de mayor importancia por su domesticación y superficie cultivada son *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum pubescens* Ruíz & Pavón, *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum chinense* Jacq. (Bosland y Votava, 2012; Carrizo *et al.*, 2013). México es centro de origen y diversidad de *C. annuum* y además se encuentran presentes las especies *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. chinense*. En este sentido Aguilar *et al.* (2010) reportan para México 56 tipos de chile entre cultivados, semicultivados y silvestres. Recientemente Vera-Sánchez *et al.* (2016) mencionan 64 tipos de chile (95 % de éstos pertenecen a *C. annuum*), los que se distribuyen principalmente en las zonas centro, sur y sureste de México.

En México el chile es el octavo cultivo en cuanto a valor económico, con un volumen promedio de producción de 2.2 millones de toneladas anuales, de las cuales se exportan cerca de 900 mil en diferentes presentaciones (fresco, seco, polvo, entre otros) (SIAP, 2018). La importancia de este cultivo radica en su valor económico, alimenticio (especias y vegetales) y como generador de mano de obra. Es materia prima para la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética e industrial (Aza-González *et al.*, 2011).

Recibido: 10 de abril de 2017
Aceptado: 23 de mayo de 2018

En particular, el chile habanero (*C. chinense* Jacq.) es distintivo de la Península de Yucatán, México. Fue introducido por el Caribe, se adaptó a las condiciones agroecológicas y al manejo tradicional de los agricultores yucatecos; además, se integró a la cultura y gastronomía de la región, de donde se dispersó a todo el país, y actualmente se siembra a nivel comercial en, al menos, 17 estados (Latournerie *et al.*, 2002). El chile habanero tiene características propias como el aroma, sabor, consistencia, picor, entre otras; con base en lo anterior, el 4 de junio de 2010 se otorgó la denominación de origen como "Chile habanero de la Península de Yucatán" (IMPI, 2010) y posteriormente se originó la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-189-SCFI-2012 Chile habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum chinense* Jacq.) Especificaciones y métodos de prueba (Secretaría de Economía, 2012). En la Península de Yucatán se producen alrededor de 3500 t anuales que son comercializadas principalmente en fresco y en menor grado procesadas.

La variabilidad del chile habanero ha sido analizada vía caracterización fenotípica (Latournerie *et al.*, 2002), caracterización isoenzimática (Corona-Torres *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2000), evaluación agronómica (Latournerie-Moreno *et al.*, 2015) y caracterización bioquímica (Coutinho *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2010). Los trabajos a nivel molecular son escasos; por ejemplo, se han realizado estudios de diversidad entre las cinco especies de *Capsicum*, donde se incluye al chile habanero como un componente (Dias *et al.*, 2013; Lijun y Xuexiao, 2012); pero no se tienen reportes de estudios de la diversidad genética existente exclusivamente en el germoplasma de chile habanero.

Como complemento a la caracterización morfológica se utilizan los marcadores moleculares. Entre los diferentes tipos de marcadores para estudiar la diversidad genética sobresalen los SSR (Simple Sequence Repeats) y los ISSR. Los SSR son codominantes y se les considera ideales para la identificación genética individualizada (Jones *et al.*, 2010); además, tienen cobertura extensiva del genoma, localización específica en los cromosomas, entre otras ventajas. Una de las desventajas de estos marcadores es que requiere considerable infraestructura en laboratorio y presupuesto (Kalia *et al.*, 2011). Los ISSR, son segmentos de ADN localizados entre secuencias repetitivas de nucleótidos, que generalmente aparecen en regiones no codificantes del genoma, son dominantes, fácilmente reproducibles y no afectados por el ambiente (Laurentin, 2009), y son de bajo costo para evaluar diversidad genética (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2005); además, permiten realizar estudios intra e interespecíficos. El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la diversidad genética de germoplasma de chile habanero de la Península de Yucatán y Tabasco, México, mediante marcadores genéticos del tipo ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El germoplasma estuvo conformado por 60 accesiones de chile habanero que se recolectaron en los estados de Yucatán (40), Campeche (7), Quintana Roo (5) y Tabasco (8). Con base en el color de los frutos a la madurez, 27 fueron de color rojo, 25 naranja, 4 amarillo y 4 morado (Cuadro 1). Las accesiones provienen de los trabajos de recolección realizados por la Red de Chile del SINAREFI-SNICS-SAGARPA (Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura-Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) entre 2006 y 2014. La estrategia de colecta se basó en el color de frutos a la madurez y se recolectó un máximo de cinco accesiones por comunidad por variante identificada, así como por la región donde se siembran. Cada accesión se constituyó de al menos 20 plantas muestreadas al azar en los campos de cultivo y en el caso de solares o traspatio de cinco a 10 plantas. Para el presente trabajo cada colecta o accesión se consideró como una población, dado que es representativa de un área determinada con base en la estrategia de recolección usada.

Extracción de ADN

Se utilizaron tres hojas de cinco plantas de cada accesión (1 g de muestra) de una edad de 45 días después de la siembra (sembradas en condiciones protegidas el 15 de junio de 2015). Para la extracción de ADN genómico se utilizó el protocolo de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) descrito por Doyle y Doyle (1987), modificado al 3 % para *C. chinense*. La integridad del ADN fue verificada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, la concentración mediante absorbancia a 260 nm y la pureza a través de la relación de absorbancias 260/280.

Amplificación de ADN por PCR

Se evaluaron inicialmente 17 iniciadores ISSR (Invitrogene™), de éstos solamente se seleccionaron los tres que amplificaron de manera consistente, clara y que presentaron el mayor nivel de polimorfismo. Cada banda ISSR fue considerada como un locus independiente (Cuadro 2). La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Foster City, CA, USA). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 µL, que contenían 20 pmol de iniciador, buffer de reacción (20 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl), 2U de Taq ADN polimerasa, 2.0 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP y 40 ng de ADN genómico. Los perfiles de temperatura fueron de 5 min a 94 ºC, seguidos de 35 ciclos

Cuadro 1. Denominación, origen y color de fruto de 60 poblaciones de chile habanero de la Península de Yucatán y Tabasco analizadas mediante ISSR.

Clave	Comunidad	Municipio	Estado	Latitud N	Longitud O	Altitud (msnm)	Color de fruto
H-224	Chiná	Campeche	Campeche	19º 45′ 55.0″	90º 29′ 45.0″	20	Naranja
H-225	Xpechil	Peto	Yucatán	20º 18′ 54.0″	88º 56′ 23.3″	24	Rojo oscuro
H-235	Othón P. Blanco	Chetumal	Q. Roo	18º 39′ 14.8″	88º 46′ 14.9″	58	Naranja pálido
H-247	Mérida	Mérida	Yucatán	20º 45′ 0.00″	89º 30′ 00.0″	09	Rojo oscuro
H-249	Dzitas	Dzitas	Yucatán	20º 50′ 18.9″	88º 31′ 45.5″	35	Naranja
H-261	X-Box	Chacksinkín	Yucatán	20º 12′ 58.9″	89º 00′ 07.8″	34	Naranja
H-262	La pantera	Othón P. Blanco	Q. Roo	19º 08′ 28.8″	88º 29′ 41.0″	21	Rojo oscuro
H-263	X-Hazil	F. Carrillo Puerto	Q. Roo	19º 23′ 24.4″	88º 03′ 35.5″	20	Morado
H-264	Sabacche	Tixmehuac	Yucatán	20º 19′ 1.30″	89º 01′ 45.6″	13	Naranja
H-265	Piste	Tinum	Yucatán	20º 42′ 02.9″	88º 35′ 33.2″	30	Naranja
H-267	Muchucuxcah	Chankom	Yucatán	20º 28′ 32.7″	88º 27′ 01.7″	35	Naranja
H-269	Sabancuy	El Carmen	Campeche	18º 46′ 28.5″	90º 55′ 46.8″	28	Naranja
H-270	Sabancuy	El Carmen	Campeche	18º 46′ 28.5″	90º 55′ 46.8″	28	Naranja
H-272	Becanchen	Tekax	Yucatán	19º 52′ 40.4″	89º 12′ 56.6″	14	Rojo oscuro
H-273	Alfonso Caso	Tekax	Yucatán	20º 04′ 14.0″	89º 08′ 43.0″	10	Naranja
H-276	Oxcuxcab	Tekom	Yucatán	20º 26′ 48.8″	88º 27′ 26.2″	28	Rojo oscuro
H-277	Dzitas	Dzitas	Yucatán	20º 50′ 18.9″	88º 31′ 45.5″	35	Rojo
H-278	Chan 3 Reyes	Tizimín	Yucatán	21º 00′ 36.0″	87º 40′ 56.0″	21	Rojo oscuro
H-281	B. Juárez. 2ª. Sec.	Huimanguillo	Tabasco	18º 5′ 56.82″	93º 54′ 5.22″	17	Rojo
H-282	B. Juárez 2ª. Sec.	Huimanguillo	Tabasco	18º 5′ 56.82″	93º 54′ 5.22″	17	Naranja pálido
H-283	Tamulté de la Sabana La Ceiba	Centro	Tabasco	18º 8′ 32.04″	92º 46′ 48.6″	16	Naranja
H-285	Timul	Peto	Yucatán	20º 18′ 53.8″	88º 56′ 18.2″	31	Naranja
H-287	Mucel	Chemax	Yucatán	20º 53′ 40.9″	87º 50′ 23.9″	30	Rojo
H-289	Ejido Monte de Oro 1a. Sec.	Huimanguillo	Tabasco	17º 53′ 36.7″	93º 26′ 31.0″	14	Naranja pálido
H-290	X-Box	Chacksinkín	Yucatán	20º 12′ 58.9″	89º 00′ 7.80″	34	Naranja
H-291	Lomas Alegres 2a. sec.	Tacotalpa	Tabasco	17º 34′ 29.7″	92º 36′ 22.2″	30	Naranja
H-294	San Antonio	Conkal	Yucatán	21º 4′ 49.87″	89º 29′ 53.7″	09	Amarillo
H-295	Villa Oriente	Comalcalco	Tabasco	18º 15′ 83.4″	93º 13′ 98.0″	49	Morado
H-448	Chan 3 Reyes	Tizimín	Yucatán	20º 59′ 59.4″	87º 40′ 55,7″	22	Naranja
H-449	Dzitas	Dzitas	Yucatán	20º 50′ 36.2″	88º 31′ 45.7″	25	Rojo oscuro
H-455	Dzitas	Dzitas	Yucatán	20º 50′ 18.9″	88º 31′ 45.5″	35	Rojo
H-456	Dzitas	Dzitas	Yucatán	20º 50′ 18.9″	88º 31′ 45.5″	35	Naranja pálido
H-458	Muchucuxcah	Chankom	Yucatán	20º 28′ 32.7″	88º 27′ 01.7″	35	Rojo oscuro
H-459	Chankom	Muchucuxcah	Yucatán	20º 28′ 32.7″	88º 27′ 01.7″	35	Chocolate
H-460	Muchucuxcah	Chankom	Yucatán	20º 28′ 32.7″	88º 27′ 01.7″	35	Morado
H-461	Muchucuxcah,	Chankon	Yucatán	20º 28′ 32.7″	88º 27′ 01.7″	35	Rojo oscuro
H-462	Sabancuy	El Carmen	Campeche	18º 46′ 28.5″	90º 55′ 46.8″	28	Rojo oscuro

Cuadro 1. Continúa.

Clave	Comunidad	Municipio	Estado	Latitud N	Longitud O	Altitud (msnm)	Color de fruto
H-466	Sabancuy	Chicbul	Campeche	17º 52′ 19.0″	90º 29′ 0.00″	05	Amarillo
H-467	Sabancuy	El Carmen	Campeche	18º 46′ 28.5″	90º 55′ 46.8″	28	Rojo oscuro
H-469	Sacbecan	Tzucacab	Yucatán	19º 42′ 38.1″	89º 02′ 31.7″	82	Rojo oscuro
H-472	Ejido Juan Sarabia	Othón P. Blanco	Q. Roo	18º 30′ 11.0″	88º 28′ 55.0″	06	Naranja
H-475	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 32′ 52.9″	90º 03′ 31.5″	18	Rojo oscuro
H-476	La Pantera	Othón P. Blanco	Q- Roo	19º 08′ 28.8″	88º 29′ 41.0″	21	Rojo oscuro
H-483	Mahzucil	Tecoh	Yucatán	20º 33′ 10.7″	89º 27′ 46.3″	12	Naranja
H-495	Xocen	Valladolid	Yucatán	20º 35′ 50.3″	88º 10′ 01.3″	16	Naranja
H-497	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 31′ 13.6″	90º 04′ 01.1″	10	Naranja pálido
H-502	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 31′ 26.5″	90º 04′ 26.7″	29	Naranja pálido
H-504	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 31′ 02.3″	90º 04′ 08.5″	28	Rojo
H-505	Halachó	Halachó	Yucatán	20º 28′ 09.4″	90º 05′ 25.4″	04	Rojo
H-507	Halachó	Halachó	Yucatán	20º 28′ 58.9″	90º 05′ 18.8″	04	Rojo oscuro
H-508	Halachó	Halachó	Yucatán	20º 28′ 13.3″	90º 04′ 40.8″	02	Rojo
H-512	Valladolid	Valladolid	Yucatán	20º 41′ 22.0″	88º 12′ 06.0″	25	Rojo oscuro
H-286	Sta. María	Taxcabá	Yucatán	20º 29′ 05.6″	88º 55′ 10.9″	28	Naranja
H-464	Sabancuy	El Carmen	Campeche	18º 46′ 28.5″	90º 55′ 46.8″	28	Rojo
H-496	Tekom	Tekom	Yucatán	20º 36′ 18.5″	88º 16′ 03.2″	24	Rojo
H-506	Halachó	Halachó	Yucatán	20º 29′ 07.9″	90º 05′ 17.3″	03	Rojo
H-497	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 31′ 01.1″	90º 03′ 31.5″	18	Rojo
H-518	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 32′ 52.9″	90º 03′ 31.5″	18	Amarillo
H-519	Gral. Cepeda	Halachó	Yucatán	20º 32′ 52.9″	90º 03′ 31.5″	18	Amarillo
H-532	El Triunfo	Balancán	Tabasco	17º 55′ 15.0″	90º 10′ 15.0″	30	Naranja

de: 1 min a 94 ºC, 1 min a 53, 49 o 44 ºC (dependiendo del iniciador) y 2 min a 72 ºC, con extensión final de 5 min a 72 ºC. Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1X, pH 8, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV (Benchtop UV trasluminator UVP®, Upland, CA, USA).

Análisis de datos genéticos

Los datos se registraron en una matriz binaria 1 y 0; donde el 1 indicó presencia y el 0 ausencia de bandas. El análisis de la información se realizó con el programa POPGENE V 1.31 (Yeh *et al.*, 1999); se calcularon los siguientes parámetros: 1) diversidad genética mediante el porcentaje de loci polimórficos (PLP), 2) la diversidad génica de Nei (H_e), índice de diversidad de Shannon (I), 3) diversidad intrapoblacional (H_s), 4) flujo genético entre poblaciones (N_m) y 5) índice de diferenciación entre poblaciones (G_{st}). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados jerárquicos por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages), calculado con las distancias Euclidianas como medida de similitud, con el programa NTSYS (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System) version 2.0 (Rohlf, 1998).

Cuadro 2. Descripción de los tres iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de chile habanero.

Símbolo	Iniciador 5′- 3′[1]	Secuencia del iniciador	Tm (ºC)
P1	$(AC)_8$YC	ACACACACACACACYC	53.0
P2	$(AG)_8$YC	AGAGAGAGAGAGAGYC	48.8
P3	$(GACA)_3$YR	GACAGACAGACAYR	44.0

R = (A, G); Y = (C, T).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variabilidad genética

El análisis de 60 poblaciones de chile habanero con tres iniciadores ISSR seleccionados permitió identificar un total de 32 bandas, cada una considerada como un locus; el tamaño de las bandas varió de 300 a 1500 pb (Figura 1) y 98 % de loci polimórficos (Cuadro 3). Al respecto, en México se han realizado varios estudios relacionados con diversidad genética en diferentes tipos de chiles cultivados y silvestres de *C. annuum*; entre ellos, Contreras *et al.* (2011) en 55 poblaciones de chile Poblano del estado de Puebla reportaron 105 alelos en total y 5.53 alelos por locus para 19 loci SSR y polimorfismo de 80 %, el cual es inferior al encontrado en el presente trabajo. Toledo-Aguilar *et al.* (2016) utilizaron 24 loci de SSR, para analizar la diversidad genética de chile ancho y encontraron 220 alelos, con un promedio de 9.2 alelos por locus en 44 accesiones de ese tipo de chile.

Con el mismo tipo de marcador SSR, también se han reportado estudios de diversidad genética entre diferentes especies de *Capsicum*; por ejemplo, Dhaliwal *et al.* (2014), en 64 accesiones de tres especies de *Capsicum* de la India (*C. annuum*, *C. Chinense* y *C. frutescens*) utilizaron 27 loci SSR y obtuvieron 75 alelos en total y 2.78 alelos por locus. Por su parte, Hanáček *et al.* (2009) analizaron 41 accesiones de diferentes tipos de *C. annuum* de la India con 8 loci SSR y reportaron 28 alelos en total, 3.5 alelos por locus, con 62.5 % de loci polimórficos. Ibiza *et al.* (2012) observaron un promedio de 14.5 alelos por locus con 10 loci SSR en 270 poblaciones de la región de los Andes pertenecientes a cinco especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens*). En general, los diferentes estudios sugieren que el uso de un mayor número de iniciadores no implica encontrar un mayor número de alelos por locus. Lo anterior refuerza la importancia de usar marcadores moleculares específicos que permitan identificar mayor polimorfismo dentro y entre las poblaciones bajo estudio.

La heterocigosidad esperada (He) en poblaciones de chile habanero fue de 0.40. Al respecto, diversos estudios reportan mayor He con microsatélites (SSR) en poblaciones silvestres de chile (*C. annuum* var. *grabiusculum*), cuyos valores de He (0.47 a 0.78) superan los de chiles cultivados (*C. annuum* L.) que varían entre 0.42 y 0.59 (Hernández, 2014; Nicolaï *et al.* 2013; Pacheco-Olvera *et al.*, 2012).

El índice de diversidad de Shannon (I) en el germoplasma de chile habanero analizado fue de 0.59 (Cuadro 3), el cual

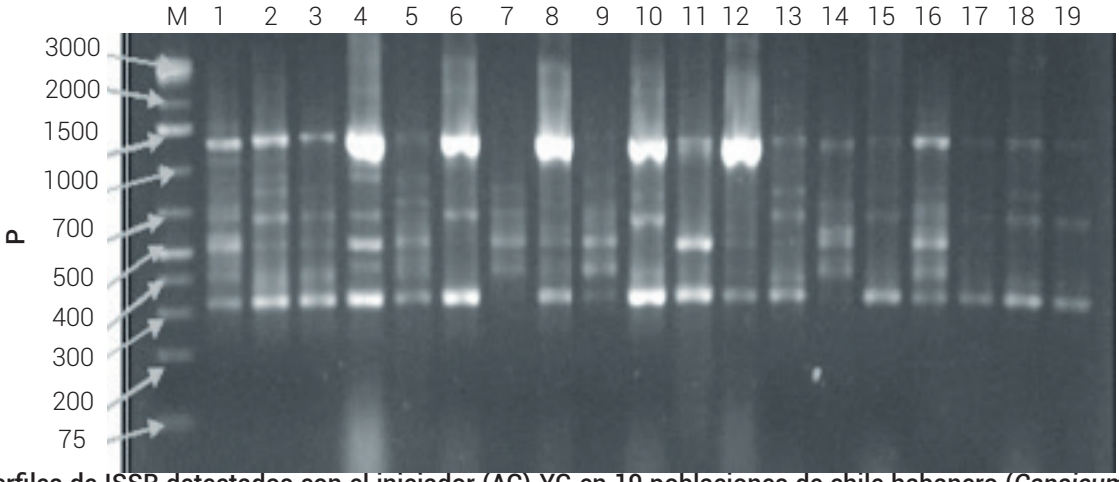


Figura 1. Perfiles de ISSR detectados con el iniciador $(AC)_8YG$ en 19 poblaciones de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en gel de agarosa al 2 %. El carril M corresponde a la escalera molecular.

Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética en germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con tres iniciadores ISSR.

PLP (%)	NLP	Na	Ne	He	I	H_s	Nm	G_{st}
98	3	2	1.7 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.39	10.57	0.045

PLP: porcentaje de loci polimórficos, NLP: número de loci polimórficos, Na: número de alelos observados, Ne: número de alelos esperados, He: heterocigosidad esperada (Índice de Nei, 1973), I: índice de diversidad de Shannon, Hs: heterocigosidad intrapoblacional, Nm: flujo génico, Gst: coeficiente de diferenciación genética.

indica una diversidad intermedia entre las poblaciones de chile habanero estudiadas. Los resultados del presente estudio superan el valor de 0.33 reportado por Lijun y Xuexiao (2012), en el cual incluyeron las cinco especies domesticadas de *Capsicum* (Hanáček *et al.*, 2009). Al respecto, Dawson *et al.* (1995) indican que el índice de diversidad de Shannon no es sensible a efectos del sesgo causado por la incapacidad de detectar a heterocigotos.

Diferenciación genética en las poblaciones

Los valores del índice de diferenciación genética (G_{st}) indican la proporción de la diversidad genética entre las poblaciones involucradas (Sounigo *et al.*, 2005). La diferenciación genética entre las poblaciones de chile habanero de la Península de Yucatán y Tabasco resultó baja (G_{st} = 0.045), lo que indica que las poblaciones están poco diferenciadas, y que la mayor proporción de la diversidad genética (95.5 %) está representada dentro de las poblaciones de chile habanero (variación intra-poblacional) (Cuadro 3). Eguiarte *et al.* (2015) mencionan que, desde el punto de vista molecular, se esperarían bajos valores de diversidad genética de una pequeña muestra de la población que proviene de una reducida distribución geográfica de un material endémico. Lijun y Xuexiao (2012) observaron valores de G_{st} = 0.17 en cinco especies de *Capsicum*, mientras que Oyama *et al.* (2006) reportaron un valor de G_{st} de 0.32 en *C. annuum* (chile Serrano, Jalapeño y Morrón) del noroeste de México, el cual supera por mucho al encontrado en esta investigación con *C. chinense*.

De los resultados mencionados, se puede establecer que hay mayor diferenciación entre poblaciones que pertenecen a diferentes tipos de chile que entre poblaciones que corresponden a un mismo tipo de chile y de una región en particular, como es el caso del chile habanero. Al respecto, Lijun y Xuexiao (2012) y Oyama *et al.* (2006) mencionan que estos resultados están influenciados por el tipo de marcador utilizado, número de muestras analizadas, origen de las muestras, y por los diferentes tipos de chiles analizados y reportados en la literatura. En las poblaciones estudiadas de chiles habanero se encontró baja heterocigosidad intrapoblacional (Hs = 0.39) lo que indica moderada variabilidad genética en las poblaciones.

La baja diferenciación genética observada entre poblaciones de chile habanero se explica por el elevado flujo génico (Nm = 10.57) detectado entre las 60 poblaciones analizadas. Lo anterior indica que existen al menos 10 individuos migrantes en los materiales analizados. Estos resultados se explican en parte por las altas tasas de polinización cruzada que se reportan en *C. chinense* (Corona-Torres *et al.*, 2000), lo cual depende en gran medida de la biología floral, la temperatura y la presencia de insectos polinizadores (abejas principalmente), durante la etapa de floración. También contribuyen a la baja diferenciación genética otros factores como la anatomía de la planta, barreras geográficas, expresión genética e interacción genotipo-ambiente (Eguiarte *et al.*, 1993).

Relación genética interpoblacional

Con base en el análisis de componentes principales (ACP), los tres primeros componentes explicaron el 62.24 % de la variación genética total observada. El CP1 contribuyó con el 43.4 % de la variación total, mientras que los CP2 y CP3 aportaron el 11 y 7.9 % de la variación total acumulada, respectivamente (Cuadro 4). La variación observada en los primeros tres componentes concuerda con la baja estructura genética encontrada en las poblaciones estudiadas. Valores inferiores fueron reportados por Contreras *et al.* (2011) en chile poblano y ancho (*C. annum* L.), así como Toledo-Aguilar *et al.* (2016) con chile ancho (*C. annum* L.). Sus valores explicaron el 50.5 % de la variación total observada, con 10 componentes principales, para lo cual usaron marcadores microsatélites (SSR).

Con base en un plano cartesiano generado por los componentes principales CP1 y CP2 (Figura 2) el germoplasma evaluado se integró en tres grupos (I, II, III) y siete poblaciones (H262, H224, H504, H448, H458, H497 y H449) quedaron en forma independiente. El grupo I, integrado por 29 poblaciones, de las cuales el 65 % son originarias del estado de Yucatán, 13 % de Tabasco, 10 % de Campeche y 6 % de Quintana Roo. El grupo II se constituyó por ocho poblaciones, de las cuales seis (75 %) son originarias del estado de Yucatán, una (12.5 %) de Tabasco y una (12.5 %) de Campeche. El grupo III quedó conformado por 16 poblaciones, la mayoría de estas provenientes de Yucatán (62 %) y el resto de Tabasco (16 %), Quintana Roo (16 %) y Campeche (16 %).

Con base en el ACP de las 60 poblaciones evaluadas se puede establecer que el germoplasma de chile habanero ha migrado de Yucatán a las otras áreas de colecta. Esta migración es posible que se haya dado por semilla y por plántulas transportadas de Yucatán a Quintana Roo y Campeche principalmente, por lo que estas poblaciones están genéticamente más relacionadas dentro de grupos. Resultados similares fueron reportados por McLeod *et al.* (1982) con isoenzimas, quienes sugirieron que una mayor proporción del género *Capsicum* surgió de la parte central del sur de Bolivia, con una subsecuente migración hacia los Andes y a las tierras bajas del Amazonas.

Análisis de similitud

Los resultados del análisis de agrupamiento por el

Cuadro 4. Valores propios, proporción de varianza explicada y varianza acumulada a partir de la matriz de correlaciones de los 32 alelos de tres iniciadores ISSR en 60 poblaciones de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

Componentes	Valores propios	% Varianza	% Var. Acumulada
1	26.0	43.4	43.4
2	6.6	11.0	54.3
3	4.7	7.9	62.2

método de UPGMA con las 60 poblaciones de chile habanero (Figura 3) se complementan con el ACP. El método UPGMA mostró tres grupos bien definidos (Grupos 2, 3 y 4) y tres grupos independientes (Grupos 1, 5 y 6). El grupo 2 se integró por tres subgrupos bien diferenciados, donde sobresale el subgrupo integrado por dos poblaciones (H247 y H281) originario del estado de Yucatán, y que se separan del resto del grupo 2. También se observó que dentro del grupo 2, las poblaciones de Yucatán H249 y H261 son idénticas genéticamente entre sí. Esto puede estar relacionado con el sistema informal de semillas que usan los agricultores para satisfacer sus necesidades para la siembra, el cual constituye un sistema dinámico muy importante para mantener la diversidad que cultivan los agricultores de subsistencia (Poudel *et al.*, 2015). El movimiento de semilla se da principalmente entre familiares, conocidos, etc., por lo que una variedad puede ser desplazada de una región a otra (Hodgkin *et al.*, 2007). Sobresale el grupo 4, por ser el único grupo que se integró con poblaciones de Yucatán (H495, H502, H504 y H512) y que se separa del resto de los grupos, lo que indica mayor diferenciación genética de este grupo.

Las poblaciones H224 originaria del estado de Campeche (grupo 1), H262 originaria del estado de Quintana Roo (grupo 5) y H458 del estado Yucatán (grupo 6) se agruparon de forma independiente, las cuales presentaron la mayor diferenciación genética entre el germoplasma estudiado del chile habanero, lo que es indicativo que la diversidad se está generando entre los estados de la Península de Yucatán y en particular en mayor grado dentro del estado de Yucatán; es decir, el flujo de genes entre estas poblaciones es limitado debido al aislamiento geográfico de las áreas donde se cultiva cada población. Resultados similares fueron reportados por Naino Jika *et al.* (2017) quienes encontraron un reducido flujo de genes entre variedades criollas manejadas por diferentes grupos étnicos en África.

Con base en el ACP y análisis de agrupamiento con ISSR, se puede señalar que la diversidad en chile habanero en general no se asocia con el lugar de origen de las poblaciones (Cuadro 1), lo cual coincide con lo obtenido por Lijun y Xuexiao (2012), quienes estudiaron la variabilidad genética en cinco especies de *Capsicum* con 15 iniciadores ISSR (entre ellos AC_8YG, utilizado en el presente estudio), donde concluyeron que el agrupamiento jerárquico no se asoció con el sitio de origen de las variedades estudiadas. De la misma forma, no se encontró relación entre el color del fruto y la diversidad observada a nivel de marcadores moleculares. Por otro lado, la mayoría de las poblaciones de Campeche y Quintana Roo, y todas las de Tabasco (H281,

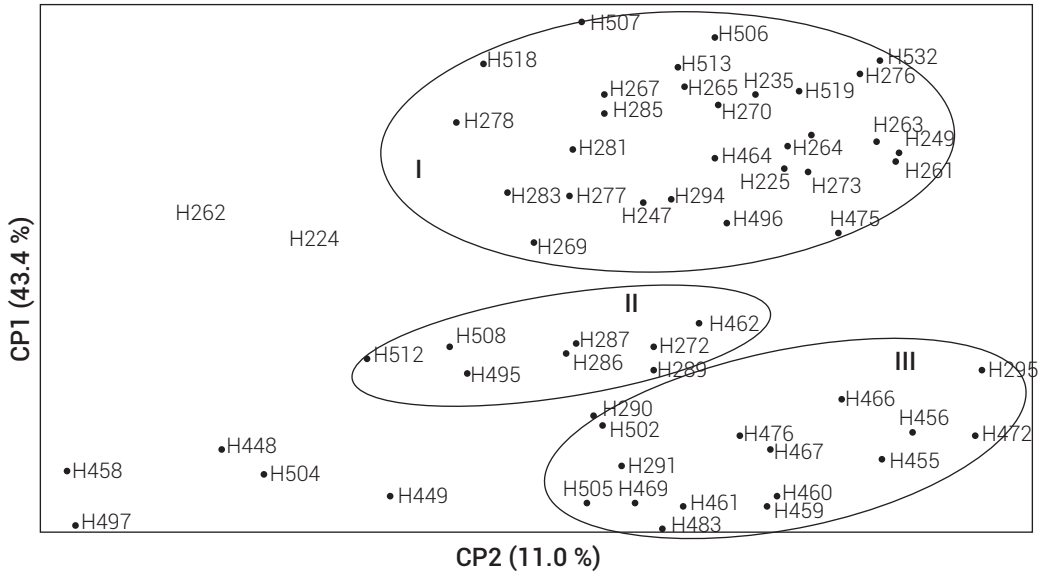


Figura 2. Dispersión de 60 poblaciones de chile habanero con base en los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) obtenidos de 32 alelos con tres iniciadores ISSR.

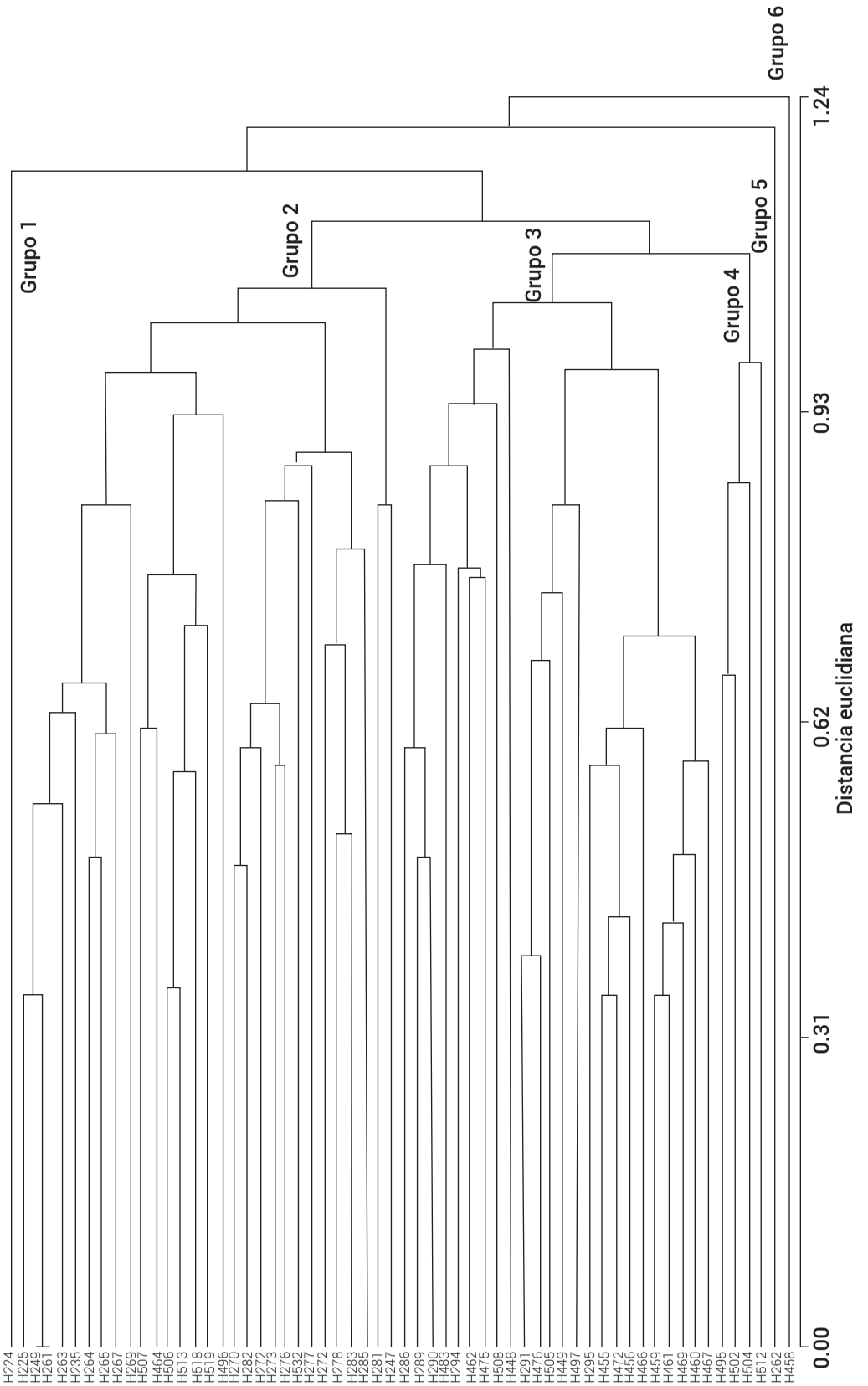


Figura 3. Dendrograma jerárquico con el método UPGMA que representa el agrupamiento genético de 60 poblaciones de chile habanero recolectadas en la Península de Yucatán y Tabasco.

H282, H283, H289, H291, H295 y H532) quedaron integradas genéticamente con las poblaciones de Yucatán, lo cual sugiere que se originaron a partir de éstas. Las diferentes condiciones ambientales y de manejo han generado ciertos cambios fenotípicos entre las poblaciones que salieron de Yucatán, pero no se detecta una fuerte diferenciación genética entre ellas.

CONCLUSIONES

La diversidad genética en las poblaciones de chile habanero colectadas en la Península de Yucatán y Tabasco es relativamente alta. El germoplasma de chile habanero muestra mayor variación genética dentro de las poblaciones que entre ellas y se presenta alto flujo génico entre las poblaciones. Las poblaciones de chile habanero del estado de Yucatán presentan la mayor variación genética, lo cual confirma al estado de Yucatán como centro de dispersión de chile habanero en el sureste mexicano. No se encontró relación entre la diversidad genética observada y el lugar de origen de las poblaciones.

BILIOGRAFÍA

Aguilar R. V. H., T. Corona T., P. López L., L. Latournerie M., M. Ramírez M., H. Villalón M. y J. A. Aguilar C. (2010) Los chiles de México y su Distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.

Aza-González C., H. G. Núñez-Palenius and N. Ochoa-Alejo (2011) Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports* 30:695-706. http://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8

Bosland P. W. and E. y J. Votava (2012) Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. Crop Production Science in Horticulture. 2nd edition. CABI Publishing. Wallinford, UK. 230 p.

Carrizo G. C., M. Sterpetti, P. Volpi, M. Ummarino and F. Saccardo (2013) Wild capsicums: identification and in situ analysis of Brazilian species. *In*: Breakthroughs in the Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Proceedings of the XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Torino, Italy. 2-4 September 2013. S. Lanteri and G. L. Rotino (eds.). I Love Books. Delmar, New York. pp:205-213.

Contreras T. A. R., H. López S., A. Santacruz V., E. Valadez M., V. H. Aguilar R., T. Corona T. y P. A. López (2011) Diversidad genética en México de variedades nativas de chile 'Poblano' mediante microsatélites. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34:225-232.

Corona-Torres T., A. García-Velázquez, F. Castillo-González, V. Montero-Tavera y H. S. Azpiroz-Rivero (2000) Caracterización isoenzimática de la diversidad genética de colectas de chile (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6:5-17, http//dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.1999.04.033

Coutinho J. P., G. F. Barbero, O. F. Avellán, A. Garcés- Claver, H. T. Godoy, M. Palma and C. G. Barroso (2015) Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. *Talanta* 134:256–263. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.004

Dawson I. K., A. J. Simons, R. Waugh and W. Powell (1995) Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity* 74:10-18, https//doi.org/10.1038/hdy.1995.2

Dhaliwal M. S., A. Yadav and S. K. Jindal (2014) Molecular characterization and diversity analysis in chilli pepper using simple sequence repeats (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 13:3137-3143, https://doi.org/10.5897/AJB2014.13695

Dias G. B., V. M. Gomes, T. M. S Morales, U. P. Zottich, G. R. Rabelo, A. O. Carvalho, M. Moulin, L. S. A. Gonçalves, R. Rodrigues and M. Da Cunha (2013) Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research* 12:6488-6501. https://doi.org/10.4238/2013.February.28.29

Doyle J. J. and J. L. Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Eguiarte L. E., A. Búrquez, J. Rodríguez, M. Martínez-Ramos, J. Sarukhán and D. Piñero (1993) Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution* 47:75-87, https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01200.x

Eguiarte L. E., E. Aguirre-Planter, E. Scheinvar, A. González G. and V. Sousa (2015) Diferenciación, flujo génico y estructura genética de las poblaciones con énfasis en especies de plantas mexicanas. *In*: Evolución Orgánica. A. Becerra, A. Castañeda y D. Piñero (coords.). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp:10-13.

Guzman I., S. Hamby, J. Romero, P. W. Bosland, and M. A. O'Connell (2010) Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science* 179:49-59, https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.014

Hanáček P., T. Vyhnánek, M. Rohrer, J. Cieslarová and H. Stavělíková (2009) DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers. *Horticultural Scicience* 36:127-132, https://doi.org/10.17221/7/2009-HORTSCI

Hernández V. S. (2014) Importancia del chile silvestre (*Capsicum annuum*) como recurso genético de México. *Mensaje Bioquímico* 41:289-303.

Hodgkin T., R. Rana, J. Tuxill, D. Balma, A. Subedi, I. Mar, D. Karamura, R. Valdivia, L. Collado, L. Latournerie-Moreno, M. Saduki, M. Sawadogo, A. H. D. Brown and D. I. Jarvis (2007) Seed systems and crop genetic diversity in agroecosystems. *In:* Managing Biodiversity in Agricultural Ecosystems. D. I. Jarvis, C. Padoch and H. D. Cooper (eds.). Bioversity International. Columbia University Press. New York, NY. USA. pp:77-116, https://doi.org/10.7312/jarv13648-006

Howard L. R., S. T. Talcott, C. H. Brenes and B. Villalon (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1713-1720, https://doi.org/10.1021/jf990916t

Ibiza V. P., J. Blanca, J. Cañizares and F. Nuez (2012) Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:1077-1088, https://doi.org/10.1007/s10722-011-9744-z

IMPI, Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (2010) Declaratoria General de Protección de la Denominación de Origen Chile Habanero de la Península de Yucatán. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección. México, D.F. 4 de junio de 2010.

Jones A. G., C. M. Small, K. A. Paczolt and N. L. Ratterman (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10:6-30, https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x

Kalia R. K., M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh and A. K. Dhawan (2011) Microsatellite Markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309-334, https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9

Latournerie M. L., J. L. Chávez S., M. Pérez P., G. Castañón N., S. A. Rodríguez H., L. M. Arias R. y P. Ramírez V. (2002) Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25:25-33.

Latournerie-Moreno L., J. S. López-Vázquez, G. Castañón-Nájera, J. O. Mijangos-Cortéz, G. Espadas-Villamil, A. Pérez-Gutiérrez y E. Ruiz-Sánchez (2015) Evaluación agronómica de chile habanero (*Capsicum Chinense* Jacq.). *Agroproductividad* 8:24-29.

Laurentin H. (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:277-292, https://doi.org/10.1007/s10722-008-9397-8

Lijun O. and Z. Xuexiao (2012) Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity of five cultivated pepper species. *African*

Journal of Biotechnology 11:752-757, https://doi.org/10.5897/AJB10.2551

Mc Leod M. J., S. I. Guttman and W. H. Eshbaugh (1982) Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Economic Botany* 36:361-368.

Naino Jika A. N., Y. Dussert, C. Raimond, E. Garine, A. Luxereau, N. Takvorian, R.S. Djermacoye, T. Adam and T. Robert (2017) Unexpected pattern of pearl millet genetic diversity among ethno-linguistic groups in the Lake Chad Basin. *Heredity* 118:491-502, https://doi.org/10.1038/hdy.2016.128

Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70:3321-3323.

Nicolaï M., M. Cantet, V. Lefebvre, A. M. Sage-Palloix and A. Palloix (2013) Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:2375-2390, https://doi.org/10.1007/s10722-013-0006-0

Oyama K, S. Hernández-Verdugo, C. Sánchez, A. González-Rodríguez, P. Sánchez-Peña, J. A. Garzón-Tiznado and A. Casas (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, https://doi.org/10.1007/s10722-004-2363-1

Pacheco-Olvera A., S. Hernández-Verdugo, V. Rocha-Ramírez, A. González-Rodríguez and K. Oyama (2012) Genetic diversity and structure of pepper (*Capsicum annuum* L.) from Northwestern Mexico analyzed by microsatellite markers. *Crop Science* 52:231-241, https://doi.org/10.2135/cropsci2011.06.0319

Poudel D., B. Sthapit and P. Shrestha (2015) An analysis of social seed network and its contribution to on-farm conservation of crop genetic diversity in Nepal. *International Journal of Biodiversity* 312621:1-13, https://doi.org/10.1155/2015/312621.

Rohlf F. J. (1998) NTSYS pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Versión 2.1. User Guide. Exeter Software. Setauket, New York. 38 p.

Secretaría de Economía (2012) Norma Oficial Mexicana NOM-189-SCFI-2012, Chile Habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum Chinense* Jacq.) Especificaciones y Métodos de Prueba. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección. México, D.F. 30 de diciembre de 2012.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2018) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA. Ciudad de México. http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola (Junio 2018).

Sounigo O., R. Umaharan, Y. Christopher, A. Sankar and S. Ramdahin (2005) Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG,T) using Isozyme electrophoresis and RAPD. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:1111-1120, https://doi.org/10.1007/s10722-004-6110-4

Toledo-Aguilar R., H. López-Sánchez, A. Santacruz-Varela, E. Valadez-Moctezuma, P. A. López, V. H. Aguilar-Rincón, V. A. González-Hernández and H. Vaquera-Huerta (2016) Characterization of genetic diversity of native 'Ancho' chili populations of Mexico using microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 7:18-26.

Vera-Sánchez K. S., J. Cadena-Iñiguez, L. Latournerie-Moreno, J. F. Santiaguillo-Hernández, A. Rodríguez-Contreras, F. A. Basurto-Peña, D. Castro-Lara, E. Rodríguez-Guzmán, P. López-López y E. Rios-Santos (2016) Conservación y Utilización Sostenible de las Hortalizas Nativas de México. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México, D. F. 132 p.

Yeh F. C., C. Yang and T. Boyle (1999) POPGENE, Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Edmonton, Canada. https://sites.ualberta.ca/fyeh/popgne.pdf (Enero 2016).

Zizumbo-Villarreal D., P. Colunga-GarcíaMarín, E. Payró C., P. Delgado-Valerio and P. Gepts (2005) Population structure and evolutionary dynamics of wild weedy domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science* 45:1073-1083.