

ESTRUCTURA Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES SILVESTRES Y DOMESTICADAS DE CHILE DEL NOROESTE DE MÉXICO ANALIZADA CON ISOENZIMAS Y RAPDs

GENETIC STRUCTURE AND DIFFERENTIATION OF WILD AND DOMESTICATED POPULATIONS OF PEPPER FROM NORTHWESTERN MÉXICO AS ANALIZED BY ISOZYMES AND RAPDs

Sergio Hernández Verdugo^{1*}, Antonio González Rodríguez², Pedro Sánchez Peña¹, Alejandro Casas² y Ken Oyama²

¹Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Km 17.5 Carretera Culiacán-El Dorado. 80000, Culiacán Sinaloa, México.

²Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. Michoacán, México.

* Autor para correspondencia (Sergioh2002mx@yahoo.com.mx)

RESUMEN

Se determinó la estructura y variación genética de 18 poblaciones silvestres y tres domesticadas de chile (*Capsicum annuum* L.) del noroeste de México con isoenzimas y RAPDs. El análisis con isoenzimas se basó en 12 *loci* polimórficos de nueve isoenzimas. Todas las poblaciones mostraron altos niveles de variación genética ($A = 2.72$, $P = 90.8\%$, $He = 0.445$ para las poblaciones silvestres; y $A = 2.60$, $P = 84.6\%$, $He = 0.404$, para las poblaciones domesticadas). La mayor proporción de la variación genética se encontró dentro, más que entre poblaciones. Sin embargo, la diferenciación fue mayor entre las poblaciones domesticadas ($G_{ST} = 0.167$) que entre las silvestres ($G_{ST} = 0.056$). El análisis con los RAPDs efectuado con diez iniciadores produjo un total de 166 bandas, todas polimórficas en las poblaciones silvestres. De 126 bandas 25 fueron polimórficas en las poblaciones domesticadas. El porcentaje de polimorfismo promedio fue 34.2 y 34.7 en las poblaciones silvestres y domesticadas, respectivamente. La diversidad genética promedio y total fue 0.069 y 0.165 para las poblaciones silvestres y 0.081 y 0.131 para las poblaciones domesticadas. El AMOVA mostró que la diversidad genética total fue distribuida igualmente entre (50.0 y 48.9 %) y dentro (50.0 y 51.1 %) de las poblaciones silvestres y domesticadas. Las poblaciones silvestres y domesticadas se separaron claramente en el dendrograma UPGMA construido con los datos de las isoenzimas (DG promedio = 0.182) y con el AMOVA (17.2 % de la varianza estuvo entre tipos de poblaciones, $P \leq 0.001$). Las distancias genéticas considerables encontradas entre variedades (DG promedio = 0.212 con isoenzimas) sugiere que los cambios asociados con la domesticación han ocurrido en direcciones diferentes.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, genética de poblaciones, diferenciación genética, conservación de recursos genéticos.

SUMMARY

The structure and genetic variation of 18 wild and three domesticated populations of pepper (*Capsicum annuum* L.) from northwestern México were determined by isozymes and RAPDs. The isozyme analysis was based on 12 polymorphic loci from nine isozymes. All populations showed high genetic variation ($A = 2.72$, $P = 90.8\%$, $He = 0.445$ for wild populations; and $A = 2.60$, $P = 84.6\%$, $He = 0.404$, for domesticated populations). Most genetic variation occurred within rather than among populations. However, genetic differentiation was greater among domesticated ($G_{ST} = 0.167$) than among wild ($G_{ST} = 0.056$) populations. The RAPDs analysis performed with ten primers produced a total of 166 bands, all polymorphic in wild populations. Out of 126 bands, 25 were polymorphic in domesticated populations. Mean percentage of polymorphism was 34.2 and 34.7 % in wild and domesticated populations, respectively. Mean and total genetic diversity were 0.069 and 0.165 for wild populations, and 0.081 and 0.131 for domesticated populations. AMOVA showed that total genetic diversity was equally distributed among (50.0 and 48.9 %) and within (50.0 and 51.1 %) of both, wild and domesticated populations. Wild and domesticated populations were clearly differentiated in the UPGMA dendrogram built from isozymes data (average GD = 0.182), as well as by AMOVA (17.2 % of variance was among populations types, $P \leq 0.001$). The considerable genetic distances found among varieties (average GD = 0.212 with isozymes) suggest that genetic changes associated with domestication have occurred in different directions.

Index words: *Capsicum annuum*, population genetics, genetic differentiation, genetic resources conservation.

INTRODUCCIÓN

Conocer los niveles de variación genética y su distribución dentro y entre poblaciones es importante para comprender el origen y evolución de las poblaciones vegetales en condiciones naturales. Determinar esta variación genética en razas locales, variedades comerciales y sus parientes silvestres, es útil para fitomejoradores y genetistas de poblaciones, y para todos los involucrados en el uso, manejo y conservación de recursos genéticos vegetales. La distribución no aleatoria de la variación genética entre poblaciones de la misma especie se conoce como estructura genética de esas poblaciones, estructura que está determinada por factores genéticos, como tasa de mutación, derivación genética, selección natural, flujo génico y sistemas de apareamiento; así como por factores ecológicos que incluyen la historia de vida, distribución geográfica y mecanismos de dispersión de las especies (Hamrick y Godt, 1999).

Durante sus procesos de domesticación, las especies cultivadas se han dispersado fuera de sus centros de origen, y se han adaptado a diferentes condiciones ecológicas y sujetado a fuertes presiones de selección; esto ha conducido a modificaciones en sus sistemas naturales de apareamiento y en sus mecanismos de dispersión, así como a cambios en morfología, fisiología y estructura genética de

las poblaciones. Los parientes silvestres de las especies cultivadas constituyen un recurso genético importante que puede contribuir a resolver problemas agrícolas presentes o futuros relacionados con la tolerancia o la resistencia a plagas y enfermedades, y aumentar la calidad y la cantidad de la producción (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998).

Las relaciones evolutivas dentro y entre las especies domesticadas de *Capsicum* se han analizado mediante estudios morfológicos y citogenéticos, así como a través de marcadores moleculares, que incluyen isoenzimas y RAPDs (McLeod *et al.*, 1983; Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989; Paran *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1999; Hernández-Verdugo *et al.*, 2001a). Los estudios efectuados con isoenzimas (McLeod *et al.*, 1983; Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989) mostraron que tanto las poblaciones silvestres como las domesticadas de *Capsicum* mantienen niveles bajos de variación genética, y que la mayor parte de esa variación se presenta entre poblaciones. Los estudios con marcadores moleculares basados en la amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPDs) (Paran *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1999) indican que el genoma de *Capsicum annuum* posee niveles de polimorfismo molecular bajos. Sin embargo, todos estos estudios se han hecho con muestras procedentes de accesiones de bancos de germoplasma de diferentes partes del mundo, incluyendo México, lo cual podría conducir a la subestimación de la variación genética contenida en las poblaciones que crecen en condiciones naturales. Rodríguez *et al.* (1999) encontraron que las poblaciones silvestres y domesticadas de *C. annuum* formaron un grupo indiferenciado a nivel molecular.

En el presente estudio se analizaron poblaciones de *C. annuum* del noroeste de México mediante marcadores moleculares isoenzimáticos y RAPDs a partir de muestras de poblaciones silvestres colectadas en condiciones naturales y de poblaciones domesticadas colectadas en campo, con los objetivos de: 1) Estimar los niveles de diversidad y patrones de distribución genética dentro y entre poblaciones silvestres y domesticadas de chile; 2) Comparar los resultados de este estudio con los reportados previamente a partir de accesiones agronómicas de esta especie; y 3) Determinar si los dos grupos de poblaciones se diferencian a nivel molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se tomaron muestras de 18 poblaciones silvestres y de tres domesticadas de *C. annuum* en dos años distintos. En 1995 se colectaron 10 poblaciones y en 2001 se colectaron las restantes. Dos poblaciones silvestres se localizaron en Sonora y otras dos en Nayarit; el resto se colectaron en Sinaloa. Dos de las tres poblaciones

domesticadas pertenecen a los chiles picosos tipo "serranos" y "jalapeños" y una a los chiles dulces tipo "morón".

Electroforesis de proteínas. Se analizaron muestras de 40 individuos de cada una de las diez poblaciones silvestres y tres domesticadas colectadas en 1995, mediante la técnica de electroforesis de almidón. Se analizaron doce *loci* polimórficos pertenecientes a nueve sistemas enzimáticos en tres sistemas de geles. En el sistema C de maíz (*Zea mays L.*) se resolvieron las enzimas glutamato oxalacetato transaminasa (GOT, E.C.2.6.1.1), peroxidasa (APX y CPX, E.C.1.1.1.7), enzima málica (ME, E.C. 1.1.1.40) y fosfoglucosa-isomerasa (PGI, E.C.5.3.1.9). En el sistema D de maíz se resolvieron isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C.1.1.142), malato deshidrogenasa (MDH, E.C.1.1.1.37), y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD, E.C.1.1.1.44), y en el sistema PP se resolvieron las enzimas fosfatasa ácida (ACPH, E.C.3.1.3.2) y menadiona reductasa (MNR, E.C.1.6.9.2). Los detalles adicionales, así como los procedimientos de tinción fueron previamente descritos por Hernández-Verdugo *et al.* (2001a).

Aislamiento de ADN y amplificación de los RAPDs. El ADN se aisló del tejido de hojas con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990) y la amplificación se hizo en un termociclador con un programa de 45 ciclos; cada ciclo consistió en 1 min a 94 °C para la desnaturización, 1 min a 38 °C para la alineación y una extensión a 72 °C durante 2 min. Se añadió un paso final de extensión a 72 °C por 15 min. Con base en los resultados de amplificación y reproducibilidad de las bandas, se seleccionaron diez iniciadores, de un total de 60 probados. Los iniciadores pertenecen a las series A, B y C (Laboratorios Operon). Los detalles adicionales fueron descritos por Oyama *et al.* (2006).

Análisis estadístico. Con los datos de las isoenzimas se estimó: el número promedio de alelos por *locus* (*A*), la proporción de *loci* polimórficos (*P*), la heterocigosis promedio observada (*Ho*) y la heterocigosis promedio esperada (*He*) bajo apareamiento al azar. Se estimaron los parámetros de diversidad genética (*H_T*, *H_S*, *D_{ST}* y *G_{ST}*) de Nei (1973) y las distancias genéticas de Nei (1972) entre todos los pares de poblaciones; con los datos obtenidos se elaboró una matriz de distancias genéticas que se utilizó para construir un dendrograma con el método de agrupamiento con promedios aritméticos no ponderados (UPGMA). Para cada uno de los iniciadores, los fragmentos amplificados con el mismo peso molecular (pb) se registraron como presentes (1) o ausentes (0), y la matriz binaria resultante se usó en los análisis. Se estimó el porcentaje de polimorfismo promedio (*P*). Para determinar la estructura genética de las poblaciones se efectuó un análisis molecular de

varianza no paramétrico (AMOVA), donde se utilizaron sólo las bandas con frecuencias menores a $1 - (3/n)$, donde n es el tamaño de muestra de una población (Lynch y Milligan, 1994). Los análisis se efectuaron con el programa POPGENE versión 1.21 (Yeh *et al.*, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación genética

El número promedio de alelos por *locus* (A) en las poblaciones silvestres fue 2.7 y 2.6 para las domesticadas. El porcentaje de *loci* polimórficos (P) fue 90.8 y 84.6 para las poblaciones silvestres y domesticadas, respectivamente. La heterocigosis promedio observada fue 0.30 para las poblaciones silvestres y 0.26 para las domesticadas. La heterocigosis promedio esperada para las poblaciones silvestres fue 0.45 y 0.41, para las cultivadas. En todas las poblaciones $H_e > H_o$, lo cual indica que hay un exceso de individuos homocigotos.

Los diez iniciadores seleccionados produjeron un total de 166 bandas, todas ellas polimórficas en las poblaciones silvestres. En las poblaciones domesticadas se registraron solamente 126 bandas, de las cuales 125 fueron polimórficas. Todas las bandas registradas se presentaron en las poblaciones silvestres, pero 40 bandas presentes en las poblaciones silvestres estuvieron ausentes en las poblaciones domesticadas. El polimorfismo promedio en las poblaciones silvestres fue 34.2 % y 34.7 % en las domesticadas. La diversidad genética promedio dentro (H_s) de las poblaciones silvestres fue 0.069 y de las cultivadas 0.081. Sin embargo, la diversidad genética total (H_t) de las poblaciones silvestres fue 0.165 y de las cultivadas fue 0.131.

Estos valores de variación genética estimados en las poblaciones silvestres y domesticadas de *C. annuum* fueron mayores que los reportados previamente para esta especie (McLeod *et al.*, 1983; Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989; Paran *et al.*, 1998) en accesiones procedentes de bancos de germoplasma de EE.UU., México y Europa. McLeod *et al.* (1983) reportaron valores de $A = 1.5$, $P = 30.7$, $H_e = 0.012$ para poblaciones silvestres, y $A = 1.4$, $P = 26.9$ y $H_e = 0.003$ para las domesticadas de *C. annuum*. Loaiza-Figueroa *et al.* (1989) estimaron valores de heterocigosis esperada bajo el equilibrio Hardy-Weinberg de 0.012 para las cinco especies cultivadas de *Capsicum* y de 0.025 para sus parientes silvestres más cercanos. Paran *et al.* (1998) estimaron un porcentaje promedio de polimorfismo de 22.0 en 34 accesiones de *C. annuum* analizadas también con marcadores RAPDs.

Todos los autores anteriores estudiaron accesiones pertenecientes a bancos de germoplasma *ex situ*; es decir, se-

millas mantenidas fuera de las condiciones naturales en las que se encuentran las poblaciones silvestres de la especie. Los bajos niveles de diversidad genética encontrados por estos investigadores pueden deberse a una desviación en el muestreo, producida por tomar una o pocas plantas madre y ocasionalmente de un mismo fruto, lo cual podría conducir a subestimar la diversidad genética de la especie. Adicionalmente, el análisis de plantas endogámicas derivadas de apareamientos entre individuos emparentados aumenta la proporción de individuos homocigóticos a expensas de los heterocigotos. Esta elevada variación genética encontrada en las poblaciones de *C. annuum* del noroeste de México es concordante con los elevados niveles de diversidad morfológica, fisiológica y de resistencia a geminivirus (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998, 2001 b,c).

Diferenciación genética entre poblaciones

La diversidad genética total estimada con las isoenzimas fue alta en ambos tipos de poblaciones, silvestres ($H_t = 0.50$) y domesticadas ($H_t = 0.53$). La mayor parte de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones, tanto en las silvestres ($H_s = 0.47$), como en las domesticadas ($H_s = 0.43$). Sin embargo, la diversidad genética entre poblaciones fue mayor en las poblaciones domesticadas ($D_{ST} = 0.09$) que en las silvestres ($D_{ST} = 0.03$). El coeficiente de diferenciación genética fue también menor entre las poblaciones silvestres ($G_{ST} = 0.06$) que entre las domesticadas ($G_{ST} = 0.17$); lo que significa que en las poblaciones silvestres, alrededor del 6 % de la variación genética se encuentra entre las poblaciones y el resto (94 %) dentro de ellas. En las poblaciones domesticadas el 17 % de la variación genética se encontró entre las poblaciones y el 83 % dentro de las mismas. Estos niveles de diferenciación encontrados dentro de las poblaciones silvestres y domesticadas de chile fueron menores que los reportados previamente por Loaiza-Figueroa *et al.* (1989) para cinco especies de chiles domesticados ($G_{ST} = 0.91$) y para sus parientes silvestres más cercanos ($G_{ST} = 0.90$). Los altos niveles de diferenciación genética encontrados por Loaiza-Figueroa *et al.* (1989) pueden deberse a que esos autores colocaron dentro de la categoría "silvestre" y "domesticado" muestras de individuos pertenecientes a las cinco especies domesticadas de *Capsicum* y sus parientes más cercanos. Este procedimiento aumenta la diversidad genética total dentro de cada grupo de poblaciones. Además, el análisis basado en muestras procedentes de accesiones subestima la variación genética dentro de las poblaciones, pues las semillas pueden provenir de una o pocas plantas madre. Debido a las relaciones: $D_{ST} = H_t - H_s$, y $G_{ST} = D_{ST} / H_t$, un aumento en la diversidad genética total (H_t), junto con una disminución de la diversidad genética dentro de las poblaciones (H_s), producirá un

aumento en la diferenciación absoluta y relativa de las poblaciones.

Las poblaciones silvestres y domesticadas se separaron claramente en el dendrograma UPGMA (Figura 1) con una distancia genética (DG) promedio de 0.182. Las poblaciones silvestres se diferenciaron entre sí por una DG promedio = 0.048, mientras que las domesticadas presentaron una DG promedio = 0.212. Esta diferenciación genética relativamente alta entre las poblaciones domesticadas sugiere que los cambios producidos por la domesticación han ocurrido en direcciones diferentes.

El AMOVA efectuado con las 54 bandas RAPDs registradas en las poblaciones silvestres y domesticadas que cumplieron con el criterio de Lynch y Milligan (1994)

mostró que 17.2 % de la variación genética total se distribuyó entre ambos grupos de poblaciones (Cuadro 1). Este valor fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.0011$), lo que indicó también la clara distinción entre ellas. Esto es contrario a los resultados de Rodríguez *et al.* (1999), quienes analizaron 100 accesiones de *C. annuum* y encontraron que las poblaciones silvestres y domesticadas formaron un solo grupo. Esto pudo deberse tanto a la diferencia propia entre las poblaciones estudiadas como a los iniciadores utilizados. Los resultados apoyan la separación entre ambos grupos como dos variedades taxonómicas: *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser y Pickergill para los chiles silvestres y *C. annuum* var. *annuum* para los domesticados (Hernández-Verdugo *et al.*, 1999).

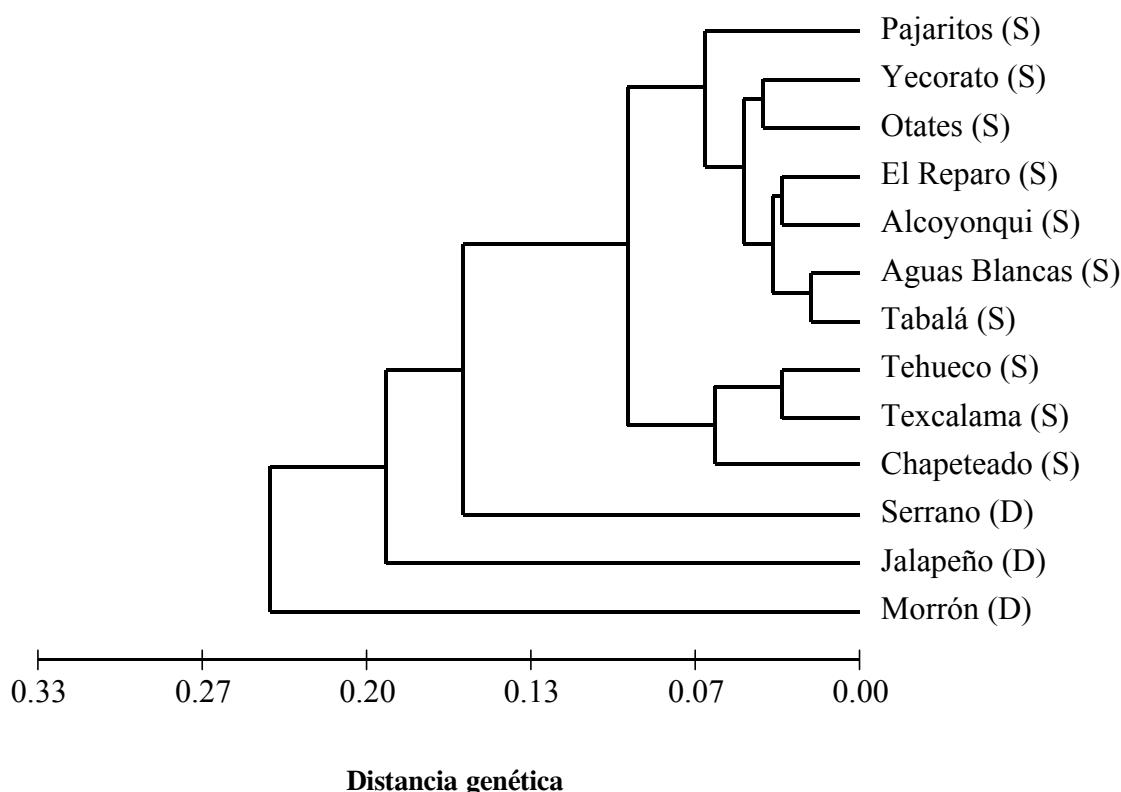


Figura 1. Dendrograma UPGMA de las distancias genéticas entre las poblaciones silvestres (S) y domesticadas (D) de *C. annuum*.

Cuadro 1. Resumen del análisis molecular de varianza (AMOVA) efectuado con 54 loci RAPDs en quince poblaciones silvestres y tres domesticadas de C. annuum.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza (%)	Varianza (%)	P
Silvestres vs. domesticados	1	80.6	0.599	17.2	0.0011
Entre poblaciones	16	387.2	1.283	36.8	< 0.0001
Dentro de poblaciones	300	481.1	1.604	46.0	< 0.0001
<i>Silvestres</i>					
Entre poblaciones	14	734.9	2.844	50.0	< 0.0001
Dentro de poblaciones	247	702.5	2.844	50.0	< 0.0001
<i>Domesticadas</i>					
Entre poblaciones	2	71.5	1.813	48.9	< 0.0001
Dentro de poblaciones	53	100.5	1.897	51.1	< 0.0001

gl = Grados de libertad.

Al considerar todas las poblaciones, 46 % ($P \leq 0.0001$) de la variación se encontró dentro y 36.8 % ($P \leq 0.0001$) entre poblaciones, lo que indica una clara estructura genética de las poblaciones estudiadas. En las poblaciones silvestres, 50 % ($P \leq 0.0001$) de la variación genética se observó dentro y 50 %, ($P \leq 0.0001$) entre poblaciones. En las poblaciones domesticadas la variación genética se distribuyó de manera similar; 48.9 % ($P \leq 0.0001$) se encontró entre y 51.1 ($P \leq 0.0001$) dentro de poblaciones. Estos resultados indican que dentro de cada grupo existe una clara estructuración genética de sus poblaciones.

CONCLUSIONES

Las poblaciones silvestres y domesticadas de chile del noroeste de México mantienen niveles de variación genética relativamente altos, con una proporción sustancial de dicha variación distribuida dentro las poblaciones. Con isoenzimas se encontró que 94 % de la diversidad genética total se distribuyó dentro, en las poblaciones silvestres y 83 % en las domesticadas. Con RAPDs 50 % de la diversidad genética total se encontró dentro, en las poblaciones silvestres y 51 % en las domesticadas. Las poblaciones silvestres y domesticadas se separaron claramente en dos grupos, lo que indica que el proceso de domesticación ha modificado la composición genética del germoplasma moderno de chile. Las altas distancias genéticas encontradas

entre las variedades comerciales de chile sugieren que los cambios producidos por la domesticación en dicho germoplasma han ocurrido en direcciones diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Doyle J J, J L Doyle (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Hamrick J T, M J W Godt (1999)** Allozyme diversity in cultivated crops. Crop Sci. 37:26-30.
- Hernández-Verdugo S, R G Guevara-González, R F Rivera-Bustamante, C Vázquez-Yanes, K Oyama (1998)** Los parientes silvestres del chile (*Capsicum spp.*) como recursos genéticos. Bol. Soc. Bot. Méx. 62:171-181.
- Hernández-Verdugo S, P Dávila, K Oyama (1999)** Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. Bol. Soc. Bot. Méx. 64:65-84.
- Hernández-Verdugo S, R Luna-Reyes, K Oyama (2001a)** Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* from Mexico. Plant Syst. Evol. 226:129-142.
- Hernández-Verdugo S, K Oyama, C Vázquez-Yanes (2001b)** Differentiation in seed germination among populations of *Capsicum annuum* along a latitudinal gradient in Mexico. Plant Ecol. 155:245-257.
- Hernández-Verdugo S, R G Guevara-González, R F Rivera-Bustamante, K Oyama (2001c)** Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus: presence of viral DNA and differentiation among populations. Euphytica 122:31-36.
- Loaiza-Figueroa F, K Ritand, J A Laborde-Cansino, S D Tanksley (1989)** Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. Plant Syst. Evol. 65:159-188.
- Lynch M, B G Milligan (1994)** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3:91-99.
- Nei M (1972)** Genetic distance between populations. Amer. Nat. 106:283-292.
- Nei M (1973)** Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:3321-3323.
- Oyama K, S Hernández-Verdugo, C Sánchez, A González-Rodríguez, P Sánchez-Peña, J A Garzón-Tiznado, A Casas (2006)** Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. Gen. Res. Crop Evol. 53:553-562
- Paran I, E Aftergood, C Chiffriss (1998)** Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. Euphytica 99:167-174.
- Rodríguez J M, T Berke, L Engle, J Nienhuis (1999)** Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Gen. 99:147-156.
- Yeh F C, R C Young, B Timothy, T B J Boyle, Z H Ye, J X Mao (1997)** POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Mol. Biol. Biotechnol. Center. University of Alberta, Canada.