

Variabilidad intragenotípica de *Capsicum chinense* Jacq. “ají Supano” provenientes de la cuenca baja del río Supe-Barranca

Intragenotypic variability of *Capsicum chinense* Jacq. “ají Supano” from the lower river basin of the Supe- Barranca

JUANA ALIAGA CAMARENA¹ Y EDWIN VEGA PORTALATINO¹

RESUMEN

Capsicum chinense “ají Supano” es un ecotipo propio de la campiña de Supe muy apreciado en la culinaria regional por su aroma y sabor. Este ecotipo a la fecha carece de estudios, por lo que el objetivo del presente estudio es determinar el patrón molecular para identificar la variabilidad intragenotípica de 30 individuos, usando marcadores moleculares ISSR. Se colectaron frutos provenientes de cuatro agricultores durante el mes de noviembre del 2016, seleccionándose al azar las semillas, para su establecimiento en macetas en casa malla. Se extrajo el ADN de tres hojas jóvenes usando el método Micro – CTAB modificado en el laboratorio de Biotecnología del PIPS en Cereales y Granos Nativos de la UNALM para su análisis molecular. Para la corrida se seleccionó los Primers SSR 22, UCB 807, UCB 810 y UCB 841 por su alta resolución y obtención de bandas; los cuales no detectaron bandas diferentes entre los individuos evaluados confirmando que es un ecotipo autógamo donde todos los individuos de la población son genéticamente iguales, por lo tanto, no existe variabilidad intragenotípica.

Palabras clave: ISSR; *Capsicum chinense* Jacq.; ají Supano; Barranca.

¹ Universidad Nacional de Barranca. Barranca, Perú.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista *Aporte Santiaguino* de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

ABSTRACT

Capsicum chinense “ají supano” is an ecotype typical of the countryside of Supe very appreciated in the regional cuisine for its aroma and flavor. This ecotype to date has no studies, so the objective of the present study is to characterize it molecularly to identify intragenotypic variability of 30 individuals of chili peppers from the lower Supe river basin using molecular markers ISSR. Fruits were collected from four farmers during the month of November, 2016, being the seeds selected randomly, for their establishment in pots in house mesh. DNA was extracted from three young leaves using the Micro - CTAB method modified by Biotechnology Lab of PIPS in Cereals and Native Crops of UNALM to molecular analysis. Primers SSR 22, UCB 807, UCB 810 and UCB 841 were selected due their high resolution and banding; which did not detect different bands among the individuals evaluated, confirming that it is an autogamous ecotype, all the individuals of the population are genetically equal, therefore there is no intragenotypic variability.

Keywords: ISSR; *Capsicum chinense* Jacq.; chili Supano; Barranca.

INTRODUCCIÓN

El ají (*Capsicum* spp.) es uno de los cultivos más importantes del mundo y está formado por alrededor de 30 especies, dentro de las cuales destacan *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. pubescens* Ruiz & Pavón, *C. chinense* Jacq. y *C. baccatum* L., como las especies cultivadas de mayor importancia (Bosland y Votava, 2012).

De acuerdo a su origen el ají proviene de las tierras bajas de la cuenca Amazónica y de ahí se dispersó a Perú durante la época prehispánica (Salaya, 2010).

Debido a la falta de conocimientos sobre diversidad genética que conservan los productores en sus parcelas de cultivo o huertos familiares, conlleva al conocimiento limitado de la distribución geográfica del género *Capsicum* y de la variabilidad de las especies que se cultivan de forma comercial y para autoconsumo. En ese sentido, los recursos fitogenéticos relacionados con el género *Capsicum*, adquieren gran relevancia por el potencial genético que presentan y por ser la base para obtener variedades mejoradas. (Moreno et al., 2011: 23 - 30)

Tradicionalmente, las especies de *Capsicum* han sido identificadas y caracterizadas descriptores morfológicos basado en el número de ramas por planta, la altura de la planta, número de frutos por planta, morfología de la flor y morfología del fruto (Fekadu et al., 2008). Sin embargo, los marcadores moleculares diferencian a los *Capsicum* con más detalles sin la interferencia causada por los efectos ambientales (Arif et al., 2010; Leal et al., 2010; Oliveira et al., 2010).

La gran mayoría de estudios reportados, mencionan que el 80% de los materiales están caracterizados con descriptores morfológicos y un 40% con caracterización bioquímica; sin embargo, no existe la caracterización molecular, a pesar que estudios recientes apoyan la decisión de incluir la caracterización molecular en el estudio de colecciones de germoplasma y en particular del género *Capsicum* (Sanwen et al., 2001; Kumar et al., 2001).

En general, la técnica de ISSR ha sido ampliamente utilizada debido a su simplicidad, rentabilidad y potencia para detectar diferencias incluso entre individuos estrechamente relacionados (Kumar et al., 2001 y Galvan et al., 2003). Esta técnica nos permite detectar la variabilidad genética a nivel del ADN genómico de cada planta (Andreev et al., 2005; Gernand et al., 2007; Jin et al., 2008).

Los marcadores moleculares ISSR han sido utilizados para varios propósitos, tales como inferencias filogenéticas (Dogan et al., 2007), evaluación de la diversidad genética (Aguilera et al., 2011), y estudios complejos de especies (Michelan et al., 2012), entre otros.

El objetivo de este trabajo es determinar si existe variabilidad intragenotípica en una muestra al azar de 30 individuos de "ají supano" a través del análisis molecular ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de la accesión *Capsicum chinense* Jacq. "ají supano" fueron colectados en la cuenca baja de río Supe – Barranca durante el mes de noviembre del 2016. Se registraron Tabla 1 y Figura 1 los datos de ubicación de las parcelas de los agricultores utilizando un GPS.

Tabla 1. Datos y coordenadas geográficas de las parcelas de colecta de frutos de *Capsicum chinense* Jacq. "Ají supano" en la cuenca baja del río Supe

Agricultor	Dávila Bueno Alejandro	Dávila Bueno Aquiles	Lara Enríquez Alfredo	Quispe Villareal Raúl
Edad (Años)	88	80	55	84
Sector	La Campiña	La Campiña	La campiña-Río Seco	Supe Pueblo
Latitud	S 10° 48' 32.36"	S 10° 48' 42.75"	S 10° 48' 1.20"	S 10° 47' 34.67"
Longitud	O 77° 41' 49.44"	O 77° 41' 25.42"	O 77° 41' 35.15"	O 77° 42' 48.30"
Altura (msnm)	51	52	58	68
Área de siembra m ²	300	100	500	150

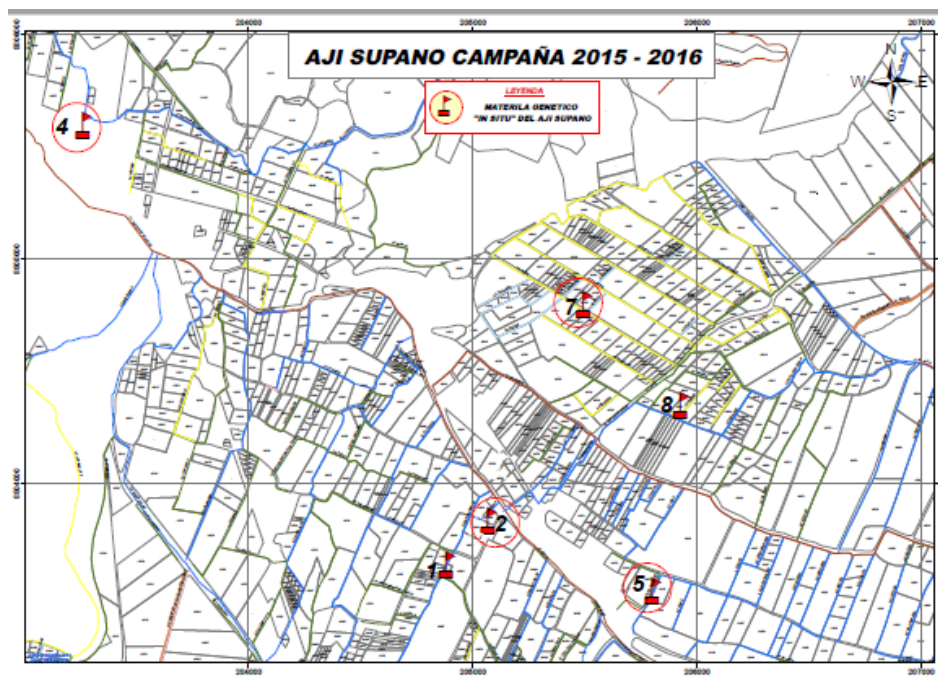


Figura 1. Ubicación geográfica de las parcelas de colecta de frutos de *Capsicum chinense* Jacq. “Ají supano” en la cuenca baja del río Supe

De los frutos colectados y posterior mezcla de semillas se seleccionaron 30 semillas al azar y se sembraron en macetas de plástico usando sustrato estéril (50% compost y 50% arena) bajo condiciones de casa malla a temperatura de 28 ± 2 °C. A los 30 días después de la siembra se tomaron 3 hojas jóvenes de cada individuo para su posterior secado en silicagel dentro de bolsas ziploc. Luego de cuatro días. Las hojas secas fueron molidas en un molino para muestras secas Mill 200 y se procedió a la extracción de ADN.

Se realizó utilizando el método Micro – CTAB (Doyle J. y Doyle, 1987) modificado en el laboratorio de Biotecnología del PIPS en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria. La cantidad y calidad del ADN se verificó utilizando un Biofotómetro IMPLMENT a una absorbancia de A260/A280 a razón de 1,7 a 1,9 y en geles de agarosa al 1%.

La amplificación de los fragmentos se realizó utilizando marcadores moleculares ISSR (Inter Single Sequence Repeats). Se utilizaron 21 marcadores ISSR para el screening preliminar. Debido a que no se pudo determinar el nivel de polimorfismo en las muestras probadas se optó por seleccionar aquellos marcadores de mayor número de fragmentos visualizados, para la corrida electroforética en geles de acrilamida con los marcadores ISSR seleccionados tabla 2.

Tabla 2. Empleo de iniciadores o Primers seleccionados para la evaluación de los 30 individuos de *Capsicum chinense* Jacq. "ají Supano" en la cuenca baja del Río Supe

Nombre del Primer	Secuencia del Primer
SSR 22	5'SSWGACAGACAGACA3'
UCB 807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT3'
UCB 810	5'GAGAGAGAGAGAGAGAT3'
UCB 841	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYC3'

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se usó 3 ul de ADN genómico en una reacción conteniendo 0,4 ul dNTPs, 1,2 ul MgCl₂, 0,4 ul primer, 2,5 ul taq polimerasa, 0,5 ul de albumina de bovino, 1 ul de buffer (10mM tris-HCl pH 8,3; 50mM KCl), 1 ul de agua esterilizada, en un volumen final de 10 ul.

Las reacciones de amplificación ISSR se usó un programa de 40 ciclos de incubación por cuatro horas de la siguiente manera: cada amplificación se añadió 6 ul de tampón de carga (95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05 de azul de bromofenol y 0,05 de xilen cianol). La muestra fue desnaturalizada a 94°C por 3 minutos y cargada en un gel vertical de poliacrilamida al 6% y 7 M de úrea, catalizada con Temed y APS (persulfato de amonio) en 1X triborato EDTA (TBE). La precorrida se realizó a 500 V por 30 minutos y la corrida con la muestra a 500 V por 6 horas. Los geles fueron revelados empleando tinción con nitrato de plata.

RESULTADOS

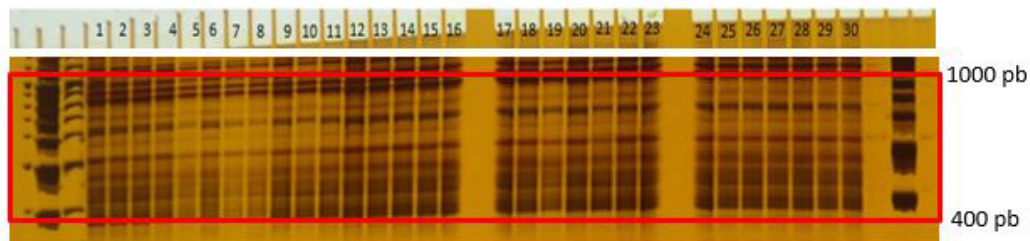
De acuerdo a la metodología utilizada en la evaluación a los 30 individuos de *Capsicum chinense* Jacq. "ají Supano" provenientes de la cuenca baja de río Supe – Barranca se seleccionó los Primers SSR 22, UCB 807, UCB 810 y UCB 841 figura 2 por su alta resolución y obtención de bandas en gel de poliacrilamida (Nascimento et al., 2010; Shafie et al., 2011).

El número de bandas para cada primer varió de 11 (UCB 810) a 14 (USB 841) con un promedio de 12,5 bandas por cebador tabla 3. Se generó un total de 1500 bandas (número de plántulas analizadas x número de clases de bandas con todos los primers ISSR), generando patrones monomórficos en todas las plántulas analizadas corroborando la homogeneidad genética de este ecotipo.

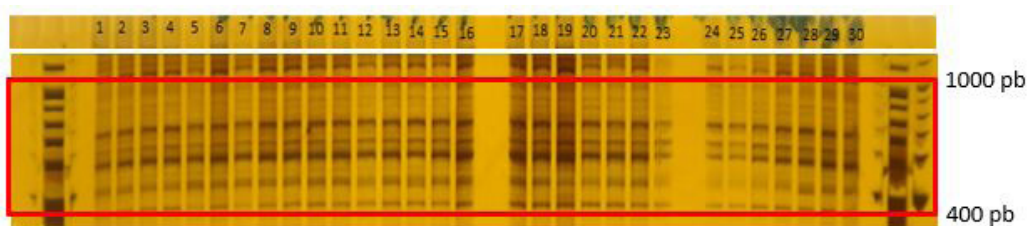
Tabla 3. Patrón de bandas del marcador ISSR evaluados en 30 individuos de *Capsicum chinense* Jacq. “ají Supano” en la cuenca baja del río Supe

ISSR Primers	Bandas mono- mórficas	Bandas po- limórficas	Número de bandas por Primers	Número total de bandas amplificadas
SSR 22	13	0	13	390
UCB 807	12	0	12	360
UCB 810	11	0	11	330
UCB 841	14	0	14	420
Total	50	0	50	1500
Promedio	12.5	0	12.5	375

Primer SSR 22



UCB 807



UCB 810



UCB 841

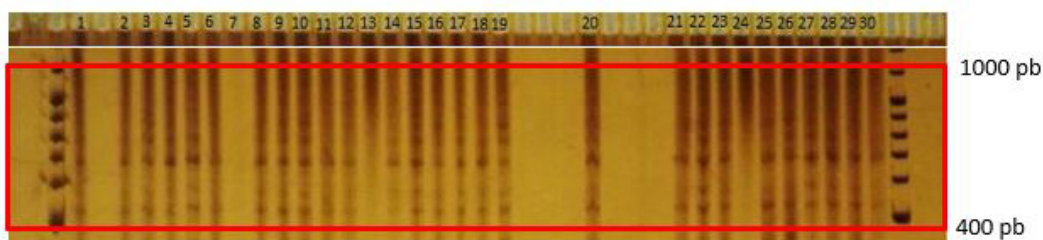


Figura 2. Corridas electroforéticas que muestran el grado monomórfico evaluado en 30 individuos del ecotipo *Capsicum chinense* Jacq. “ají Supano” provenientes de la cuenca baja de río Supe – Barranca, utilizando los marcadores ISSR.

DISCUSIÓN

La mayor utilidad de los ISSR ya fue establecida por los fitomejoradores (Deshpande et al., 2001) alrededor del mundo siendo utilizados como parámetros de apoyo para la evaluación en caracteres morfológicos para poder determinar la extensión de la diversidad y la relación dentro y entre las especies (Srivastava et al., 2004).

Christensen et al. (2007) plantea que un buen marcador molecular permite el estudio de la diversidad genética de las diferentes cultivares existentes, pero están limitadas por los recursos, es muy importante poder seleccionar cuales primers pueden ser más eficientes que otros en la determinación de la variabilidad genética de una población (Koskinen, 2004).

Uno de estos parámetros es el porcentaje de polimorfismo y distancia genética que son muy altas en variedades interespecíficas en comparación a variedades intraespecíficas de *Capsicum*. En estudios recientes el 47% de polimorfismo encontrado se ha dado dentro de las accesiones de *C. annum* y 89% entre las diferentes especies de *Capsicum* (Paran et al., 1998). Así que la tasa de polimorfismo varía dentro y entre las especies dependiendo del patrón de polinización.

También se ha reportado una estrecha relación entre *C. chinense* y *C. frutescens* documentada y descrita por estudios genéticos de similitud (Heiser y Pickersgill, 1969; Ince et al., 2010). Eshbaugh (1970) plantea que *C. frutescens* en su forma primitiva, podría haber sido el antepasado de *C. chinense*.

Muchos autores argumentan que la formación de ecotipos en especies de plantas, ocurre por la adaptación de las poblaciones a condiciones ambientales distintas a las originales (Palevitch, 1991). Así, el establecimiento de un grupo de plantas a distintas alturas, condiciones climáticas o de suelo, depende de la capacidad que tenga éste grupo para adaptarse a este ambiente (Vargas et al., 2001). Posiblemente, si el estudio se hubiera realizado para evaluar una característica morfológica, la influencia de uno o varios de los factores climáticos evaluados hubiese mostrado una correlación positiva alta, debido a un mayor efecto ambiental o de adaptabilidad (Nevo et al., 1986).

Los resultados obtenidos indican que todas las plantas de “ají Supano” colectadas de la campiña de Supe pertenecen al mismo ecotipo, debido a que las bandas formadas por cada individuo evaluado con los 4 primeros no mostraron bandas polimórficas, probablemente debido a que es una población autógena. Esto haría suponer que este ají mantiene sus características morfológicas dentro del área de estudio. Esta diversidad comparada con plantas autógenas cuyo valor de polimorfismo oscila entre 34% (e.g. *Amaranthus tricolor*: Xu y Sun, 2001), 28% (e.g. arroz: Girma et al., 2010) es menor con respecto a especies alógamas cuyo valor oscila entre 85,2% (eg. rabanito: Liu et al., 2008), 70,77% (e.g. coliflor: Astarini et al., 2006), etc., siendo menor al 50% de polimorfismo.

Según Font et al. (2014) reportaron que el durazno es la especie menos polimórfica del género *Prunus* por su condición de autogamia, revalidando los resultados obtenidos en este trabajo.

En general, la separación geográfica se considera un parámetro importante para recoger el germoplasma para el estudio de la diversidad, pero la separación geográfica no siempre predice las diferencias genéticas muy claramente (Del Rio et al., 2001).

Este estudio exploratorio, provee la justificación del seguimiento de estudios posteriores para enfocar la utilidad de este recurso genético en los programas de mejoramiento del cultivo de ají.

CONCLUSIÓN

Entre las 30 muestras analizadas de *Capsicum chinense* Jacq. “ají Supano” no se detectaron patrones electroforéticos de ADN diferentes entre ellos, lo que confirma que todos los individuos son genéticamente iguales, por lo tanto no existe variabilidad intragenotípica.

AGRADECIMIENTO

Agradecimiento especial a la Universidad Nacional de Barranca, que financió el estudio a través del proyecto "Caracterización y sostenibilidad del cultivo de *Capsicum chinense* Jacq. "ají Supano" en la Cuenca baja del río Supe, Barranca" fuente de financiamiento de Donaciones y Transferencias, Resolución N° 206-2015-CO-UNAB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, Jorge et al. 2011. Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill). *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 6: 243-252.
- Andreev, Oscar et al. 2005. Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: Parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism. *Cell Biol. Intl.* 29:21–27.
- Arif, Ibrahim et al. 2010. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2079 - 2096.
- Astarini, Ida et al. 2006. Genetic diversity of Indonesian cauliflower cultivars and their relationships with hybrid cultivars grown in Australia. *Scientia Horticulturae.* 108: 143- 150.
- Bosland, Paul y Votava Eric. 2012. Peppers: vegetable and spice *capsicums*. 2nd (Ed.). Cabi publishing. London UK. 230 p.
- Christensen, T. et al. 2007. Drosophila MCM10 in heterochromatin dynamics and DNA replication. *A. Dros. Res. Conf.* 48 : 139.
- Del Rio, A. et al. 2001. Association of ecogeographical variables and RAPD marker variation in wild potato populations of the USA. *Crop Sci.* 41: 870-878.
- Deshpande, AU. y otros 2001. Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the Western Ghats, India revealed by intersimple sequence repeats. *Molecular Ecology.* 10: 2397–2408.
- Dogan, B.; Duran, A. y Hakki. E. 2007. Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. *Annal. Bot. Fennici* 44: 353-358.
- Doyle, J. y Doyle, L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.

- Eshbaugh, W. 1970. A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*. 22: 31–43.
- Fekadu, M. et al. 2008. Genetic components and heritability of yield and yield related traits in hot pepper. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*. 4: 803 - 809.
- Font, C. et al. 2014. Phenotypic diversity among local Spanish and foreign peach and nectarine (*Prunus persica* L.) Batsch accessions. *Euphytica*. 197(2): 261-277.
- Galvan, M.; Bornet, B.; Balatti, P. y Branchard, M. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) marker as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*. 132: 297-301.
- Gernand, D. et al. 2007. Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum*. *Genome*. 50: 435–442.
- Girma, G.; Tesfaye K. y Bekele E. 2010. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis of wild and cultivated rice species from Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*. 9: 5048-5059.
- Heiser, C. y Pickersgill, B. 1969. Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). 18: 277–283.
- Ince, A.; Karaca M. y Onus, A. 2010. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. *Biochemical Genetics*. 48: 83–95.
- Jin, S. et al. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rpt*. 27:1303–1316.
- Koskinen, M. et al. 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites used in genetic population studies: an empirical perspectiva. *Hereditas* 141:61-67.
- Kumar, D. et al. 2001. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Science International*. 116: 63 - 68.
- Leal, A. et al. 2010. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines, *Genet. Mol. Res*. 9: 9 - 18.
- Liu, L. et al. 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Sci. Hort*. 116: 240- 247.

- Michelan, V. et al. 2012. Morphological and genomic characterization of *Rhynchospora tenuis* complex (Cyperaceae) and its taxonomic implication. 63: 775-784.
- Moreno, C. et al. 2011. Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (*Capsicum annuum* L.) del centro-norte de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 17: 23-30.
- Nascimento, M. et al. 2010. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations base on ISSR pattern. *Genetics and Biology*. 33(2): 394-397.
- Nevo, E. et al. 1986. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Turkey. *Genetica*. 68: 203-213.
- Oliveira, E. et al. 2010. Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting intersimple sequence repeat markers in corn (*Zea mays*). *Genet. Mol. Res.* 9: 835 - 842.
- Palevitch, D. 1991. Agronomy applied to medicinal plant conservation. In: The conservation of medicinal plants. Ed. by Akerele O., Heywood V., Synge H. Cambridge University Press. Cambridge. p. 167-178.
- Paran, L.; Aftergoot, E. y Shifriss, C. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*. 99: 167-173.
- Salaya, D. 2010. Elaboración artesanal de dos abonos líquidos fermentados y su efectividad en la producción de plántula de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestro en Ciencias. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados, Cárdenas, Tabasco. p.11-12.
- Sanwen, H. et al. 2001. Development of pepper SSR markers from sequence data bases. 117(2): 163-167.
- Shafie, M. et al. 2011. RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. *J. Med. Plant. Res.* 5(18): 4426-4437.
- Srivastava, P. et al. 2004. Genetic analysis of *Morus alba* through RAPD and ISSR markers. *Indian Journal Biotechnology*. 3: 527-532.
- Vargas, E. et al. 2001. Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild po-

pulations of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 48: 109-120.

Xu, F. y Sun, M. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain Amaranths and their wild relatives (Amaranthus; Amaranthaceae) using internal transcribed spacer, Amplified Fragment Length Polymorphism and Double-primer Fluorescent Intersimple Sequence Repeat Markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21: 372-387.

Recepción: 13/09/2018

Aceptación: 30/11/2018

Correspondencia

Juana Aliaga Camarena
jaliaga@unab.edu.pe