

VARIABILIDAD MOLECULAR DE GENOTIPOS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO PARA LA RESISTENCIA A PVY

Ivonne González*, Yailen Arias*, Madelaine Quiñones*, Ileana Miranda*, Yaritza Rodríguez**,
Belkis Peteira*

*Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),
Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: marquetti@censa.edu.cu;

**Grupo de Mejoramiento Genético de las Hortalizas. Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana
Dimitrova, Carretera Bejucal-Quivicán, Km 331/2, Quivicán, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: Los programas de mejoramiento genético constituyen alternativas para la obtención de plantas de pimiento resistentes a diversas enfermedades. Estos genotipos cuentan con una amplia variabilidad genética y los convierte en promisorios para el control del virus Y de la papa (PVY). El empleo de los marcadores RAPD constituye una herramienta útil y ampliamente utilizada en la caracterización de la diversidad genética en este cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad genética de un grupo de genotipos de pimiento obtenidos en el Programa de Mejoramiento para la resistencia a Potyvirus del I. I. H. Liliana Dimitrova, utilizando los marcadores RAPD. Los resultados obtenidos mostraron de forma general una escasa variabilidad entre los genotipos estudiados.

(Palabras clave: PVY; variabilidad genética; RAPD; *Capsicum annuum*)

MOLECULAR VARIABILITY OF PEPPER GENOTYPES (*Capsicum annuum* L.) BELONGING TO THE GENETIC BREEDING PROGRAM FOR RESISTENCE TO PVY

ABSTRACT: Genetic improvement programs are an alternative to obtain pepper genotypes resistant to several diseases. The wide genetic variability of these genotypes makes them promissory for the control of *Potato virus Y* (PVY). The RAPD markers are a useful tool to characterize the genetic diversity of pepper varieties. The aim of this work was to evaluate the genetic variability of pepper genotypes obtained in the breeding program for PVY resistance using RAPD markers. In general, the results showed a low variability between the genotypes studied.

(Keywords: PVY; genetic variability; RAPD; *Capsicum annuum*)

INTRODUCCIÓN

El pimiento es una de las hortalizas que más se consume a nivel mundial, después del tomate, debido a su exquisito sabor y elevado nivel nutricional. En nuestro país, se hace necesaria la creación de variedades sostenibles y competitivas, que contemple la producción de híbridos F1, con diferentes propósitos comerciales y un alto potencial de rendimiento, buena adaptación climática y resistencia a las principales enfermedades (1, 2, 3).

El control genético es muy utilizado por los fitomejoradores, por constituir una de las vías más eficientes utilizadas para lograr el desarrollo de este cultivo, obteniéndose líneas de pimiento multi-resistentes a las principales enfermedades, de frutos grandes y de buena adaptación para ser utilizados como progenitores de híbridos F1 más competitivos (3). El virus Y de la papa (PVY) ataca este cultivo provocando más de un 30% de pérdidas en nuestro país sobre todo cuando la infección ocurre en épocas tempranas del crecimiento (1). Los síntomas se muestran como mosaico motea-

do y arrugado de las hojas apicales, así como un bandeado oscuro de las venas de las hojas totalmente expandidas. Los síntomas en el campo varían sobre todo en relación del aislado involucrado, la especie afectada y las condiciones ambientales (4).

Los marcadores moleculares, entre los que se incluyen los RAPD (Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar) constituyen una herramienta útil para el estudio de la diversidad genética entre especies de *Capsicum* con fines mejoradores (5), debido a que son una técnica poderosa para la identificación de variaciones en la secuencia de ADN entre individuos (6, 7).

El objetivo de este trabajo fue evaluar molecularmente, a través del análisis RAPD, la existencia de diversidad genética en un grupo de genotipos de *Capsicum annuum* L. pertenecientes al programa de mejoramiento genético frente al PVY.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN

El material vegetal fue obtenido a partir de genotipos procedentes del programa de mejoramiento desarrollado en el Instituto de Investigaciones Hortícolas Lilianna Dimitrova (IIHLD), en la provincia de Mayabeque, Cuba. Los genotipos utilizados se denominaron de la siguiente forma: Líneas 2, 5, 7, 8, Híbridos 1, 2, 3, 4 y 5.

La extracción de ADN se realizó por el método de Dellaporta modificado por Salazar *et al.* (8), a partir de hojas sanas y frescas de plantas de pimiento de 21 días de germinación y fueron mantenidas en condiciones semi-controladas en casa de cristal con humedad relativa entre 80-85% y fotoperíodo natural. Los precipitados de ADN obtenidos se disolvieron en solución amortiguadora TE 1X (Tris-EDTA) y se conservaron a -20°C. La concentración de ADN total se determinó según Sambrook *et al.* (9) a 260 nm en un espectrofotómetro Ultraespec Plus Spectrophotometer Pharmacia LKB.

Condiciones de la PCR con cebadores arbitrarios

Las reacciones se desarrollaron con los siguientes cebadores arbitrarios: OPA2, OPA3, OPA9, OPA10, OPA11, OPA20, provenientes de la firma comercial Operon Technologies INC, Alameda, California. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25µL, el cual contenía: 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,001% de gelatina, 100µM de cada dNTPs, 0,2µM de cebador, 50ng de ADN genómico y 1U de Taq ADN polimerasa (Amplicon). El programa de amplificación fue de 45 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C, y un ciclo de 10 minutos a 72°C en un termociclador marca Master Cycler.

Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en solución amortiguadora TBE 0,5X (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA) a 90 voltios, y se tñeron con bromuro de etidio (9). El peso molecular de los fragmentos amplificados se estimó usando el marcador 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Los resultados de la amplificación se organizaron mediante una matriz de valores binarios, en la que las bandas se informaron como presentes [1] o como ausentes [0] en cada genotipo. El cálculo de las distancias genéticas se realizó utilizando los coeficientes de similitud, a partir de las cuales se construyó un Dendrograma. Estos análisis se realizaron mediante el empleo del programa InfoStat (10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los seis cebadores empleados amplificaron satisfactoriamente y produjeron un total de 37 bandas, con un promedio de 6,16 bandas por cebador. El cebador OPA 20 amplificó un total de 16, mientras que el OPA 09 solo amplificó una. De las 37 bandas amplificadas, sólo 24 fueron polimórficas, siendo el OPA 20 el cebador que aportó mayor porcentaje de polimorfismo debido a la amplificación de 13 de estas bandas (Tabla 1).

TABLA 1. Caracterización de genotipos de pimiento mediante RAPD y grado de polimorfismo detectado./ *Characterization of pepper genotypes by RAPD and the polymorphism level detected*

Cebadores	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Total bandas amplificadas	Total bandas polimórficas	Por ciento de polimorfismo
OPA 02	TGCCGAGCTG	5	2	40
OPA 03	AGTCAGCCAC	3	2	66,7
OPA 09	GGGTAACGCC	1	0	0
OPA 10	GTGATCGCAG	6	3	50
OPA 11	CAATCGCCGT	6	4	66,7
OPA 20	GTTGCGATCC	16	13	81,25
Total		37	24	64,7

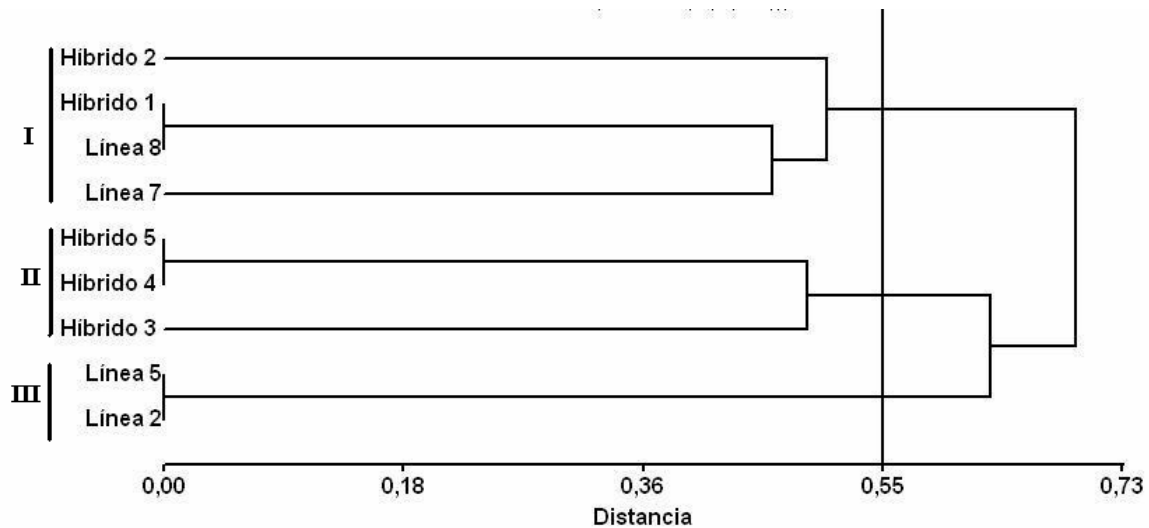


FIGURA 1. Dendrograma resultante de las distancias genéticas entre los genotipos de pimiento estudiados./ *Cluster derived from the genetic distances between the pepper genotypes studied.*

A partir de la matriz binaria, se construyó un Dendrograma utilizando el índice de Jaccard para el cálculo de las distancias genéticas, el cual mostró la formación de tres grupos con un 75,3% de similitud, lo que indica la existencia de poca variabilidad entre los genotipos estudiados (Figura 1).

El primer grupo quedó constituido por los híbridos 1 y 2 y las líneas 7 y 8, dentro del cual el híbrido 1 y la línea 8 no mostraron diferencias; el grupo II por los híbridos 3, 4 y 5. Los híbridos 4 y 5 tampoco se diferenciaron. Las líneas 2 y 5, las cuales formaron el grupo III, también se encontraron estrechamente relacionadas.

Estos resultados pueden ser explicados por la estrecha relación filogenética de los materiales empleados, así como por la naturaleza de este tipo de marcadores los cuales, al ser arbitrarios, pudieron hibridar en regiones del ADN que no estaban relacionadas con el carácter diferenciador. Similares resultados fueron obtenidos por Arias *et al.* (11) los cuales, al emplear estos cebadores, encontraron escasa variabilidad genética entre seis genotipos de *Solanum lycopersicum* L.

El empleo de los marcadores RAPD ha revolucionado los estudios de genética y mejoramiento debido a que son fáciles, poco costosos, rápidos entre otras bondades a las cuales se les añade que no hay que tener conocimiento previo de la secuencia del genoma blanco (12). Diversos trabajos previos demuestran la utilidad de estos marcadores para determinar la diversidad genética en *Capsicum*. Este es el caso de Bahrami Rad *et al.* (13), los cuales probaron la eficien-

cia de los marcadores RAPD para evaluar la variabilidad genética de 39 genotipos de *Capsicum* detectando los mayores y los menores niveles de polimorfismo con los cebadores C11 y A07 respectivamente. En el 2005, Adetula (14) realizó estudios de RAPD para identificar colecciones de germoplasma de *Capsicum* y para estimar la relación genética entre las accesiones las cuales serían usadas en el mejoramiento de la productividad y la estabilidad en el rendimiento de los cultivos.

Además, este tipo de marcadores es muy utilizado para estimar distancias genéticas, principalmente por su productividad en términos de número de marcadores por ensayo, sensibilidad, rapidez y posibilidades de automatización (15). Smith *et al.* (16) y Zhang *et al.* (17) aplicaron estos marcadores en el cálculo las distancias genéticas en maíz y arroz respectivamente. En el caso de pimiento verde, García *et al.* (18) utilizaron marcadores RAPD para calcular la distancia genética entre 28 genotipos indicando la relación cercana entre las líneas parentales P03 y P04, y P01 con P06 los cuales difirieron solamente en un 16 y un 28% de RAPD polimorfismo respectivamente, resultados que están en concordancia con los obtenidos en el presente estudio.

REFERENCIAS

1. Díaz A, Quiñones M, Hernández A, del Barrio G. Evaluación de los parámetros analíticos para la detección molecular de potyvirus que afectan al cultivo del pimiento en Cuba. *Rev Protección Veg.* 2010;25(2):80-87.

2. Depestre T. Construcción de multi-resistencia a enfermedades virales y adaptación al trópico en genotipos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y su aplicación. 2002. (En línea) Disponible en: <http://www.academiaciencias.cu/paginas/presentacion/reconocimientos/premios.asp?idp=728&nsecc=Ciencias%20Agrarias%20y%20de%20la%20Pesca>. (Consulta: 21 de abril 2011)
3. Rodríguez Y, Depestre T, Gómez O. Obtención de líneas de pimiento (*Capsicum annuum*) progenitoras de híbridos F1, resistentes a enfermedades virales, a partir del estudio de cuatro sub-poblaciones. Cien Inv Agr. 2007;34(3):237-242.
4. Díaz A, Quiñonez M, Arana F, Soto M, Hernández A. Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del pimiento en Cuba. Rev Protección Veg. 2010;25(2):69-79.
5. Geleta LF, Labuschagne MT, Viljoen CD. Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. Biodivers Conserv. 2005;14:2361-2375.
6. Venkatachalam L, Sreedhar RV, Bhagyalakshmi N. The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. Mol Phylogenet Evol. 2008;47:974-985.
7. González O, Fernández A, Fraga Y, Pino B, Hernández MM, Silava JJ. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en plantas de *Ipomoea batatas*. Cultivos tropicales. 2007;28(2):39-43.
8. Salazar E, Marín E, Rosales LC, Rodríguez MG, Enrique R, Suárez Z et al. Identificación de seis poblaciones de *Heterorhabditis* mediante el uso de marcadores moleculares. En: Resúmenes IV Congreso Internacional de Biotecnología y Agricultura, Cayo Coco, Cuba. 7-12 de mayo, 2007.
9. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
10. InfoStat. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009.
11. Arias Y, Peteira B, González I, Martínez Y, Miranda I. Variabilidad genética entre genotipos promisorios de tomate (*Solanum lycopersicum*) obtenidos en programas de mejoramiento frente al TYLCV. Rev Protección Veg. 2011;25(3):190-193.
12. Akbar N, Ahmad H, Ghafoor S, Begum K, Afridi SG, Muhammad I et al. Estimation of genetic diversity in *Capsicum* germplasm using Randomly Amplified Polymorphic DNA. Asian J Agr Sci. 2010;2(2):53-56.
13. Bahrami Rad M, Hassani ME, Mohammadi A, Lessan SH, Ghazi Zade S. Evaluation of genetic diversity in *Capsicum* spp. as revealed by RAPD markers. Acta Hort. (ISHS). 2009;829:275-278.
14. Adetula OA. Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs. Afr J Biotechnol. 2006;5(2):120-122.
15. Laucou V, Haurogn K, Ellis N, Rameau C. Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. Theor Appl Genet. 1998;97:905-915.
16. Smith OS, Smith JSC, Bowen SL, Tenborg RA, Wall SR. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. Theor Appl Genet. 1990;80:833-840.
17. Zhang Q, Saghai MA, Yang GP, Liu KD, Zhou ZQ, Gravois KA, et al. Correlations between molecular marker polymorphism and hybrid performance in rice. En: Plant Genome IV Conference. San Diego, CA. 1995, p 307.
18. García F, Salinas GE, Pozo O, Reyes H, Ramírez M, López JA, et al. Estimation of genetic distances among green pepper (*Capsicum annuum* L.) lines using RAPD markers and its relationship with heterosis. En: Proceedings of the 16th International Pepper Conference Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10-12, 2002.

(Recibido 31-5-2010; Aceptado 10-11-2010)