



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLE

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL AJÍ PAJARITO (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) EN EL PNR EL VÍNCULO USANDO SSR-HRM

Genetic Diversity of Pajarito Pepper (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) in the PNR El Vínculo using SSR-HRM

Mary Belcy BONILLA-GRANJA^{1a*} ; Ronald Andrés VIAFARA-VEGA^{1b} ; Heiber CÁRDENAS HENAO^{1c} 

¹. Grupo de estudios ecogenéticos y de biología molecular, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 # 100-00, 760032 Cali, Colombia.

^a Email: mary.bonilla@correounivalle.edu.co, ^b Email: ronald.viafara@correounivalle.edu.co, ^c Email: heiber.cardenas@correounivalle.edu.co

* For correspondence: mary.bonilla@correounivalle.edu.co

Recibido: 16th July 2024. Revisado: 17th January 2025. Aceptado: 10th February 2025

Associate Editor: Enrique Guillermo Martinez

Citation/ citar este artículo como: Bonilla-Granja, M. B., Viáfara-Vega, R. A. and Cárdenas Henao, H. (2025). Diversidad genética del ají pajarito (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en el PNR el vínculo usando SSR-HRM. *Acta Biol. Colomb.*, 30(1), 121-129. <https://doi.org/10.15446/abc.v30n1.114222>

RESUMEN

El género *Capsicum* de la familia Solanaceae contiene varias especies de ají entre las que se encuentran: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. baccatum*, de las cuales *C. annuum* es la de mayor importancia económica y mayor diversidad morfológica, siendo *C. annuum* var. *glabriusculum* un recurso genético importante para la agricultura al ser el ancestro común de las variedades domésticas de *C. annuum*. Sin embargo, los estudios poblacionales con esta especie han sido limitados a pesar de su amplia distribución. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la estructura poblacional y la diversidad genética de *C. annuum* var. *glabriusculum* en el fragmento de bosque seco más grande del Valle del Cauca, Parque Natural Regional (PNR) El Vínculo. Para ello, se extrajo ADN de tejido foliar joven, y utilizando diez marcadores microsatélites se estimó la diversidad genética y la distribución espacial. Como resultado, todos los microsatélites utilizados fueron polimórficos a excepción de Bd12. El marcador Ng18 fue el que presentó mayor número de alelos, mayor PIC y una heterocigosidad esperada (H_e) de 0,7 siendo el marcador más informativo. La heterocigosidad observada (H_o) fue de cero para todos los marcadores, y el número de genotipos registrados en la población fue de 17. Finalmente, el análisis de agrupamiento mostró la formación de tres subgrupos; sin embargo, al comparar con los valores de identidad genética de Nei, se concluye que todos los individuos pertenecen a una sola población, aunque son genéticamente diversos.

Palabras Clave: autogamia, genotipos, heterocigosidad, riqueza alélica.

ABSTRACT

The *Capsicum* genus of the Solanaceae family contains several species of peppers, among which are: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* and *C. baccatum*, of which *C. annuum* is the most economically important and morphologically diverse, being *C. annuum* var. *glabriusculum* an important genetic resource for agriculture as it is the common ancestor of the domestic varieties of *C. annuum*. However, population studies with this species have been limited despite its wide distribution. Therefore, the objective of this work was to evaluate the population structure and genetic diversity of *C. annuum* var. *glabriusculum* in the largest dry forest fragment in Valle del Cauca, El Vínculo Regional Natural Park (PNR). For this, DNA was extracted from young leaf tissue, and using ten microsatellite markers, genetic diversity and spatial distribution were estimated. As a result, all microsatellites used were polymorphic except for Bd12. The Ng18 marker had the highest number of alleles, the highest PIC, and an expected heterozygosity (H_e) of 0.7 being the most informative marker. The observed heterozygosity (H_o) was zero for all the markers, and the number of genotypes registered in the population was 17. Finally, the cluster analysis showed the formation of three subgroups. However, when comparing with Nei's genetic identity values, it is concluded that all individuals belong to a single population, although they are genetically diverse.

Keywords: Allelic richness, autogamy, genotypes, heterozygosity.



INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae, está compuesto por aproximadamente 43 especies (Barboza *et al.*, 2022), dentro de las cuales cinco (*C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. pubescens* R. y *C. baccatum* L.) contienen variantes domesticadas (Oyama *et al.*, 2006). El rango de distribución abarca desde el borde sur de los Estados Unidos hasta las zonas tropicales y templadas de Sur América incluyendo Paraguay y Argentina Central (McLeod *et al.*, 1982). Las plantas de este género son arbustos que producen flores con corolas, en su mayoría, estrelladas y con diversos patrones de pigmentación (Barboza *et al.*, 2022). Sus frutos son bayas carnosas en forma de campana con una amplia gama de tamaños y colores (Barboza *et al.*, 2022), comúnmente conocidos como ají, pimiento o chile. Estos frutos han sido ampliamente consumidos por las sociedades humanas por lo que tienen gran importancia en la agricultura (Shirasawa *et al.*, 2019), además de contener variedades dulces y picantes utilizadas como vegetales y especias (Barboza *et al.*, 2022). Por estas razones, económicamente es la segunda solanácea más importante después del tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kosi 2005).

De las especies de este género, *Capsicum annuum* tiene la mayor diversidad morfológica (Oyama *et al.*, 2006), siendo *C. annuum* var. *glabriusculum* considerado el ancestro de las variedades domésticas de chiles y pimientos y un recurso genético muy valioso para la agricultura y la alimentación (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998). En Colombia esta variedad es conocida como “ají pajarito” (D’arcy y Eshbaugh, 1974). Sin embargo, son pocos los estudios poblacionales realizados sobre esta especie (López-España *et al.*, 2017). Diversos estudios han señalado su amplia distribución en diversos climas incluyendo ambientes cálidos, áridos y semisecos, siendo especialmente abundantes a alturas inferiores a los 1500 m. s. n. m. en orillas de caminos, huertos, potreros o alrededor de cauces de ríos o arroyos, encontrándose principalmente en los bosques secos o templados desde México hasta el sur de Perú (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998).

En el departamento del Valle del Cauca existen varios fragmentos representativos de bosque seco. La mayoría se han originado a partir de áreas abandonadas por la ganadería o la agricultura y, por lo tanto, aún son sucesiones secundarias (Alvarado-Solano y Otero, 2015; Torres *et al.*, 2012). El Parque Natural Regional (PNR) El Vínculo es el fragmento de bosque seco tropical más grande del departamento con una superficie de 70 ha y más de 50 años de haberse catalogado como área de protección (IavH, 1997). Al ser un bosque fragmentado es necesario realizar estudios de diversidad genética de especies clave, para así diseñar mejores planes de conservación (Piñero *et al.*, 2008).

Los estudios de diversidad y estructura genética en plantas juegan un importante papel en estrategias de conservación más efectivas, porque proporcionan información sobre

aspectos importantes de la demografía, la reproducción y la ecología (Szczecińska *et al.*, 2016). Tanto la diversidad genética como la estructura poblacional pueden ser estudiadas utilizando marcadores moleculares (Abdel-Mawgood, 2012). Entre los marcadores moleculares más comunes se encuentran los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), análisis de minisatélites y microsatélites (Medina *et al.*, 2009), siendo estos últimos considerados ideales para estudios evolutivos (Muñoz *et al.*, 2008) y de mapeo de ligamiento (Morgante y Olivieri, 1993), debido a que además de encontrarse en todo el genoma, son altamente polimórficos y codominantes, lo que los hace útiles para detectar diferencias intra e interespecíficas y emplearlos en estimaciones de diversidad genética de muchas especies (Varshney *et al.*, 2005), entre las que se encuentran especies del género *Capsicum* (Toledo-Aguilar *et al.*, 2016).

La técnica de HRM (High Resolution Melting) es un método para el análisis Post-PCR utilizado para la identificación de variaciones en secuencias de ácidos nucleicos. Esta técnica se basa en la desnaturalización del ADN amplificado con el aumento gradual de la temperatura y a la detección en tiempo real de los pequeños cambios de fluorescencia. Para esto se emplean unos fluoróforos que se adhieren al ADN, mostrando máxima fluorescencia cuando el ADN se encuentra en doble cadena, pero va disminuyendo a medida que la temperatura aumenta y el ADN se va desnaturalizando, hasta alcanzar la tasa más alta de disminución de fluorescencia, que generalmente es la temperatura de disociación de la muestra. De esta manera se forman las curvas de disociación o *melting*. Las variaciones en las secuencias se pueden percibir por los cambios en la forma de la curva de disociación y en la temperatura de fusión. Los datos obtenidos por este proceso son analizados y manipulados con programas diseñados específicamente para el análisis de HRM (Ospina, 2019). La principal ventaja de esta tecnología es que además de ser capaz de determinar la presencia o ausencia de un alelo específico, se aplica para encontrar polimorfismos de nucleótido únicos, discriminar alelos definidos por múltiples polimorfismos o número de repeticiones en tándem y determinar el estado de metilación del ADN (Tong y Giffard, 2012). Otras ventajas que tiene esta técnica son su bajo costo, el uso de instrumentos genéricos que normalmente están disponibles en muchos laboratorios y los métodos de un solo paso y de “tubo cerrado” que reducen la posibilidad de contaminación (Frailyn *et al.* 2006; Tong y Giffard, 2012).

Con el fin de caracterizar la población de *C. annuum* var. *glabriusculum* presente en el fragmento de bosque del Parque Natural Regional El Vínculo, se evaluó la estructura poblacional, la diversidad genética y la distribución espacial, utilizando marcadores moleculares SSR-HRM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y colección de muestras

Las muestras se tomaron en el Parque Natural Regional El Vínculo, ubicado en el departamento del Valle del Cauca, municipio de Guadalajara de Buga, corregimiento El Vínculo, vertiente occidental de la Cordillera Central con coordenadas geográficas 3° 50' N y 76° 18' W y los 900-1000 m. s. n. m.

Se recolectaron 33 individuos de ají en 2 salidas de campo, una en junio de 2020 y otra salida en julio del 2021. Para ello, se realizaron muestreos en trayectos de 2 km abarcando tanto los bordes como el centro del fragmento de bosque del parque natural. Cada individuo fue georreferenciado, y se le recolectó tejido foliar joven que fue guardado en gel de sílice con indicador de humedad para facilitar el secado y evitar su degradación (Chase y Hill, 1991). Por último, para la identificación de los individuos se realizó de forma morfológica en el campo y molecular utilizando los marcadores C2, WAXY y PepTrn estandarizados por Jeong *et al.* (2010).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo a partir del tejido foliar usando el método de Doyle y Dickson (1987). Posteriormente para evaluar la calidad del ADN obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % usando el buffer TBE al 0,5X y bromuro de etidio. Para ver las bandas formadas se expuso a la luz ultravioleta y para valorar la pureza del ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro (Thermoscientific, NanoDrop 2000).

Amplificación de sistemas microsatélite

Se usaron los cebadores de los microsatélites reportados por Lee *et al.*, (2004) y Nagy *et al.* (2007), usando las condiciones de PCR estandarizadas por Guzmán (2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Microsatélites usados para la genotipificación de *C. annuum* var. *glabriusculum*, empleando la técnica HRM y condiciones de estandarización.

Marcador	Locus	PCR* (°C) (n)		Temperatura de fusión (°C)
Bd3	Hpms1-173	57	35	75,8
Bd12	Hpms1-139	58	29 ^b	78,6
Bd17	Hpms1-165	54	35	77,6
Ng6	CA515649	55	35	81,2
Ng8	CA516044	60	35	82,4
Ng9	BM061910	55	35	79,6
Ng10	CA516334	55	35	84,6
Ng15	CA515055	63	35 ^a	79,8
Ng18	CA517699	65	35 ^b	77,4
Ng33	CA516439	60	35	77,8

*Modificación en las condiciones de PCR: Temperatura de hibridación (°C) y

número de ciclos (n): ^a PCR en cascada: 63°C – 1°C/ciclo; ^b PCR en cascada: 65°C – 1°C/ciclo.

Genotipificación por técnica de HRM

Para cada reacción se utilizó 5 µl de reactivo *Precision Melt supermix*, 0,7 µM de cada cebador (forward y reverse), 30 ng de ADN y 0,1 µl de agua destilada-desionizada. Completando un volumen total de 10 µl, a excepción de los cebadores Bd17 y Ng33, con los que se utilizó una mayor cantidad de ADN, 40 ng para Bd17 y 45 ng para Ng33, en ambos se utilizó un volumen final de 15 µl. Estas reacciones se llevaron a cabo usando el equipo de *Biorad CFx96 Real Time System*.

Para la realización de las curvas de disociación de alta resolución, se desnaturalizó el ADN a 95 °C por 30 s y se bajó la temperatura a 60 °C por un minuto. Posteriormente, se elevó la temperatura desde 65 °C hasta 95 °C, aumentando la temperatura en 0,2 °C en cada ciclo, se mantuvo por 10 s para después medirse la fluorescencia. Para visualizar los resultados de las curvas de disociación se utilizó el software *Bio-Rad Precision Melt Análisis software versión 1.2* (Bio-Rad Laboratories 2012).

Análisis de los datos

Para el análisis de diversidad y estructura poblacional se evaluaron los estadísticos: Índices F de Wright (Wright 1931), heterocigosidad esperada y observada, número de alelos por locus, número efectivo de alelos y número promedio de alelos, utilizando el programa *GenAlex 6,503* (Peakall y Smouse, 2012), adicionalmente se calculó el número de genotipos. El índice de identidad (I) y la desviación estándar (DE) de las frecuencias alélicas se hallaron utilizando las siguientes ecuaciones:

$$I = \sum p^2 + \sum \sum (2 \cdot p^2 \cdot p^2)$$

$$DE = \sqrt{\frac{\sum p^2}{n} - \left(\sum \frac{p}{n}\right)^2}$$

Donde *p* simboliza la frecuencia alélica y *n* el número de muestras.

Para analizar la estructura genética en el espacio geográfico se realizó un análisis de agrupación espacial bayesiano a partir de la información geográfica y la frecuencia alélica de los individuos utilizando el paquete de R, *Geneland* versión 4.9.2 (Guillot *et al.*, 2005) y se usaron los parámetros por defecto del programa. Finalmente, para determinar las relaciones genéticas entre las subpoblaciones encontradas por *Geneland* versión 4.9.2, se construyó a partir de la matriz de distancias genéticas de Nei, un dendrograma UPGMA con el programa *MEGA 11.0.11* (Tamura *et al.*, 2022).

RESULTADOS

De los diez microsatélites evaluados en la población de *C. annuum* var. *glabriusculum* del PNR El Vínculo, todos

resultaron ser polimórficos a excepción de Bd12 que fue monomórfico. Ng8 fue el que obtuvo el mayor número de alelos con 5,0 alelos seguido de Ng15 con 4,0. Bd03 y Bd17 obtuvieron 3,0 alelos mientras que Ng6, Ng9, Ng10, Ng18 y Ng33 2,0 alelos cada uno.

Tal y como se muestra en la (tabla 2) el número promedio de alelos fue 2,6; sin embargo, el número efectivo de alelos promedio fue 1,45. Este valor varió entre 1,0 y 3,6, siendo Ng8 una vez más el marcador con el mayor número de alelos efectivo seguido de Ng9 con 1,438 alelos efectivos. Bd12 obtuvo el menor valor con 1,0, mientras que los marcadores restantes (Bd03, Bd17, Ng06, Ng10, Ng15, Ng18 y Ng33) obtuvieron valores alrededor de 1,1 alelos efectivos, evidenciando de esta forma que el 80 % de los marcadores tuvieron valores inferiores a 1,2 alelos efectivos (Tabla 2). Además, se encontraron 17 genotipos de los cuales uno abarca el 24,24 % de las muestras, mientras que los demás oscilan entre el 3,03 % y el 9,09 % de las muestras. De los 17 genotipos hallados, ocho correspondieron a genotipos únicos.

Tabla 2: Índices de diversidad genética por marcador en *C. annuum* var. *glabriusculum* del PNR El Vínculo. No. de alelos (Na), No. efectivo de alelos (Ne), Índice de información (I), Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) e índice de identidad (ID).

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	F	ID
Bd03	3,0	1,131	0,271	0,00	0,116	1,00	0,785
Bd12	1,0	1,000	0,000	0,00	0,000	#N/D	1,000
Bd17	3,0	1,145	0,291	0,00	0,127	1,00	0,767
Ng06	2,0	1,133	0,234	0,00	0,117	1,00	0,786
Ng08	5,0	3,631	1,447	0,00	0,725	1,00	0,113
Ng09	2,0	1,438	0,483	0,00	0,305	1,00	0,530
Ng10	2,0	1,069	0,146	0,00	0,064	1,00	0,877
Ng15	4,0	1,562	0,719	0,00	0,360	1,00	0,434
Ng18	2,0	1,062	0,136	0,00	0,059	1,00	0,888
Ng33	2,0	1,324	0,410	0,00	0,245	1,00	0,600
Promedio	2,6	1,45	0,414	0,00	0,212	#N/D	0,678

#N/D: No hay ningún valor disponible

La heterocigosidad observada para todos los marcadores fue cero y, en consecuencia, la endogamia estimada para todos los marcadores fue 1,00, a excepción del marcador Bd12, el cual al ser monomórfico no fue posible hallarle la endogamia. En cuanto a la heterocigosidad esperada, tuvo un valor promedio de 0,212, siendo el marcador Ng08 el que obtuvo la heterocigosidad más alta con 0,725 seguido de los marcadores Ng15 y Ng9 con 0,36 y 0,305, respectivamente. Mientras que el marcador Bd12 obtuvo la más baja (0,00), valor no muy lejano a 0,060 y 0,066 correspondientes a los marcadores Ng18 y Ng10 (Tabla 2). La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg reveló que la población estudiada no se encuentra en equilibrio en ninguno de los marcadores utilizados.

El análisis de agrupamiento realizado en Geneland indicó a $k=3$ como el número más probable de subpoblaciones de *C. annuum* var. *glabriusculum* en el PNR el Vínculo. En la (Fig. 1) se visualiza la distribución espacial de los individuos de *C. annuum* var. *glabriusculum* en el PNR El Vínculo. El grupo 1 (Fig. 2a) está conformado por 18 de los 33 individuos muestreados, y se compone principalmente de las plantas localizadas alrededor de un humedal temporal y 9 de las 12 plantas encontradas en un claro ubicado en el borde del parque, el cual aparentemente solía ser una carretera abandonada. Otras 3 plantas que se hallaron en el claro mencionado conformaron el grupo 2 (Fig. 2b). Por otro lado, en el grupo 3 (Fig. 2c) se ubicaron 12 plantas localizadas principalmente al interior del bosque o en los senderos que cruzaban el parque.

Los valores de F_{ST} obtenidos entre cada par de grupos indicaron que en general los grupos obtenidos presentan una diferenciación genética baja. En cuanto a las identidades genéticas de Nei (1978) se registraron valores entre 0,954 y 0,963, indicando que las tres subpoblaciones halladas son

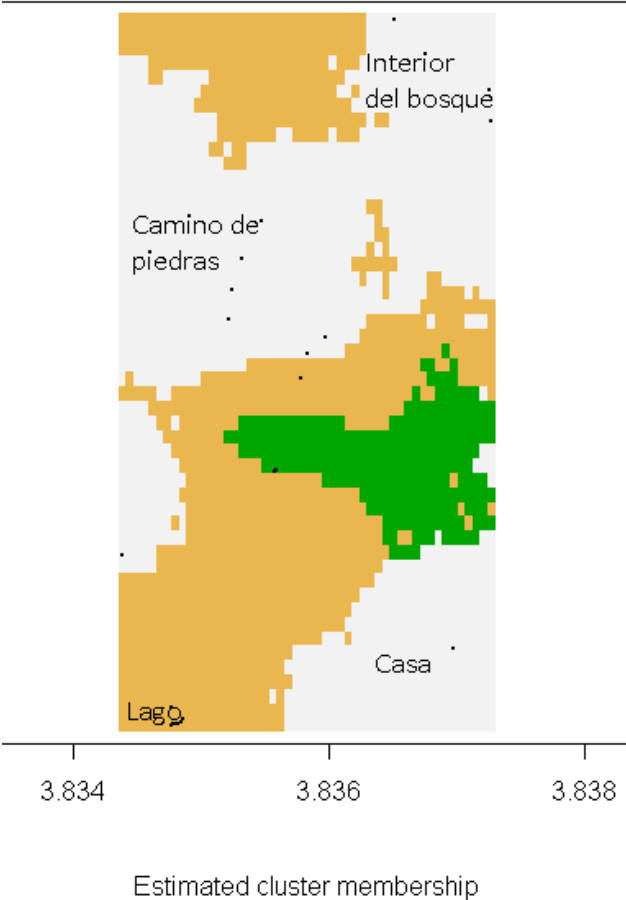


Figura 1. Distribución espacial de los grupos formados por Geneland en el PNR El Vínculo para los individuos de *C. annuum* var. *glabriusculum*. Grupo 1: Blanco; Grupo 2: Verde y Grupo 3: Naranja. Los ejes representan las coordenadas geográficas: X= latitud y Y=longitud.

muy cercanas genéticamente. A partir de los valores de la distancia genética de Nei (1978) se realizó un dendrograma de UPGMA (Fig. 3), el cual muestra la presencia de 2 grupos, el primer grupo reúne los grupos 2 y 3 en un solo clado, mientras que en el segundo solo estaban los del grupo 1, sin embargo, la distancia genética de todos los grupos fue baja.

DISCUSIÓN

De los diez sistemas microsatélites utilizados, el 90 % resultaron polimórficos, esta información coincide con lo reportado por Pacheco-Olvera (2012) en su estudio sobre la diversidad genética de *C. annuum* en el noreste de México, en el cual reportó 89,9 % de polimorfismo en los siete microsatélites utilizados en poblaciones silvestres, mientras que en las variedades seleccionadas y cultivadas reportaron un polimorfismo del 80,5 % en promedio. González-Jara *et al.* (2011) y Nicolai *et al.* (2013) reportaron marcadores microsatélites 100 % polimórficos para *C. annuum* var. *glabriusculum*. Mientras que en 2001, Hernández-Verdugo y sus colaboradores reportaron un polimorfismo del 90,8 % en poblaciones silvestres de *C. annuum* utilizando un sistema de isoenzimas. Sin embargo, los estudios de Oyama *et al.* (2006) reportaron un polimorfismo del 34,2 % para poblaciones silvestres de *C. annuum* y del 34,7 % para las poblaciones domesticadas utilizando RAPD. Con la misma técnica Savatti *et al.* (2015) reportaron un polimorfismo del 37,61 % para poblaciones cultivadas de *C. annuum* L. Lo

que sugiere que los microsatélites son más eficientes que los RAPD para encontrar polimorfismos en las especies silvestres de *C. annuum*. Sin embargo, las diferencias encontradas pueden atribuirse a la naturaleza de cada marcador.

El número promedio de alelos fue de 2,6, sin embargo, Ng8 fue el marcador que obtuvo el mayor valor con cinco alelos por locus y tuvo el mayor número de alelos efectivos con 3,5; por consiguiente, tiene el índice de información de Shannon más alto, siendo así el marcador con la mayor diversidad, además de ser el marcador más informativo al tener un PIC de 0.7. Aunque con otra técnica, Hernández-Verdugo *et al.* (2001), reportaron un valor promedio de alelos por locus de 2,7 en poblaciones silvestres de *C. annuum*, dato similar al obtenido en este estudio; sin embargo, ellos no obtuvieron ninguna isoenzima dominante ya que el valor oscilaba entre 2,5 y 2,8 alelos por locus. En contraste con estos resultados, en el 2013, Nicolai y sus colaboradores reportaron un número de alelos por locus de 8,75 en 27 accesiones de *C. annuum* var. *glabriusculum* (Nicolai *et al.*, 2013), lo cual se pudo deber a que utilizaron 28 microsatélites, un número casi tres veces mayor que el utilizado en este estudio y que las muestras provenían de diferentes partes del mundo.

En cuanto a los genotipos, de los 17 encontrados, el de mayor frecuencia estuvo en el 24,24 % de los individuos, ocho de los 17 fueron genotipos únicos (47 %), valor inferior al reportado por Aguilar-Meléndez *et al.* (2009), quienes encontraron 23 genotipos de poblaciones semi-silvestres de *C. annuum*, de las cuales 15 (65 %) fueron genotipos únicos.

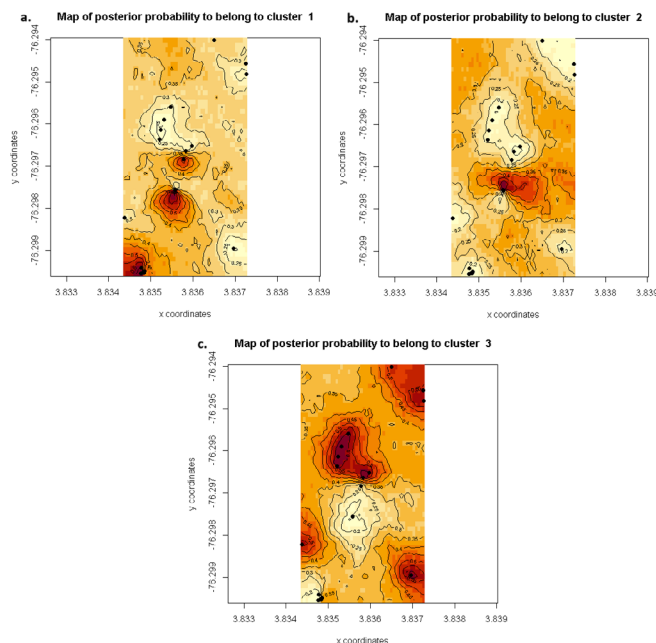


Figura 2. Mapa de probabilidad de cada uno de los tres agrupamientos creados por el programa *Geneland*. Cada punto representa un individuo de la especie *C. annuum* var. *glabriusculum*. a. grupo 1, b. grupo 2, c. grupo 3. Los ejes representan las coordenadas geográficas: X= latitud y Y=longitud.

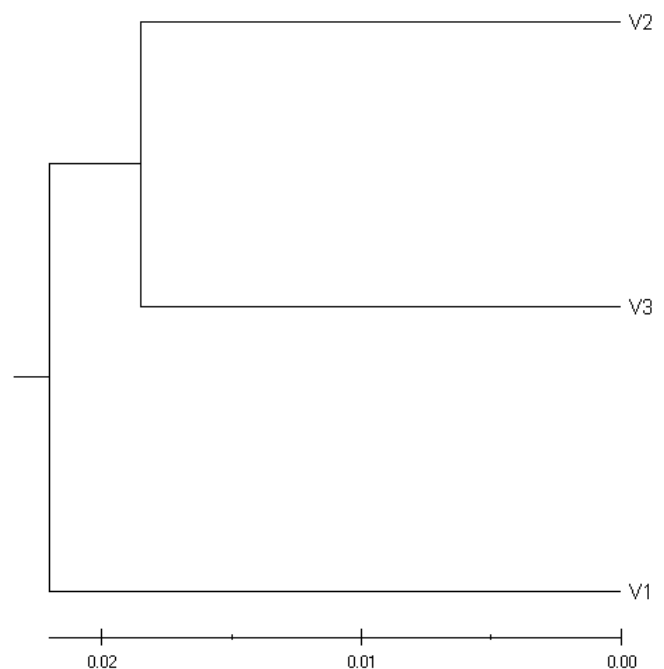


Figura 3. Dendrograma UPGMA a partir de la matriz de distancia de Nei (1978) de *C. annuum* var. *glabriusculum* en el PNR El Vínculo. El eje horizontal representa la distancia genética de Nei (1978) y el eje vertical muestra la agrupación jerárquica de los grupos.

Esta variación se pudo deber a la diferencia del tamaño muestral de ambos proyectos. Mientras que en el presente se utilizaron 33 individuos de *C. annuum* var. *glabriusculum*, en el de Aguilar-Meléndez se usaron 58 individuos de *C. annuum* semi-silvestres. Además, es posible que entre los individuos utilizados en el trabajo de Aguilar-Meléndez provinieran de diferentes variedades dando cabida a un aumento de la diversidad haplotípica. Por otro lado, Cifuentes *et al.* (2016) en su trabajo de caracterización de ají *C. annuum* variedad Cayena, utilizando SSR-HRM, evaluó cuatro líneas de *C. annuum* var. *annuum* (una original y tres sometidas a selección con 30 individuos cada una) más cinco individuos de la variedad silvestre *C. annuum* var. *glabriusculum*. Encontraron diez genotipos para la línea original y 8, 10 y 11 genotipos correspondientes a las tres líneas sometidas a selección, mientras que la variedad silvestre obtuvo 5, 0 genotipos 1, 0 por cada individuo, mostrando de esta manera una mayor variedad en comparación de las líneas domésticas.

La heterocigosidad observada para todos los marcadores fue de cero, en contraste con la heterocigosidad esperada que dio en promedio 0,212, lo que refleja una diversidad moderada y evidencia un déficit de heterocigotos en la población. Esto puede deberse a que al tener flores hermafroditas su principal forma de polinización es la autogamia, con un porcentaje de ocurrencia de alogamia que puede variar según la variedad (Justino *et al.*, 2018). Aunque son pocos los estudios de diversidad con las variedades silvestres de *Capsicum*, Nicolai *et al.*, (2013) reportó una H_o de 0,04 para *C. annuum* var. *glabriusculum*, y en ese mismo estudio hallaron la H_o de diversas especies del género *Capsicum* como: *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, *C. chacoense*, entre otros, la cual osciló entre 0,025 y 0,085. Pese a tener 28 marcadores y 1210 muestras donde incluyen diferentes especies del género *Capsicum*, la H_o no superó los 0,085. En cuanto a la H_e , para *C. annuum* var. *glabriusculum* reportaron un H_e de 0,78 representando el mayor valor obtenido comparado con las demás variedades domesticadas donde *C. annuum* var. *annuum* presentó un H_e de 0,59 seguido de *C. chacoense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, *C. chinense* y *C. baccatum* con un H_e de 0,51, 0,50, 0,49, 0,47 y 0,45, respectivamente, siendo la variedad silvestre *C. annuum* var. *glabriusculum* la que presenta la mayor diversidad tanto por heterocigosidad como por número de alelos. Sin embargo, dada la naturaleza autogámica de la especie, es importante tener en cuenta la tasa de alogamia o polinización cruzada ya que esta influye en la heterocigosis obtenida (Falconer y Mackay, 2006).

Odland y Porter en 1941 encontraron una polinización cruzada entre el 9 % y el 36 % en algunas variedades de *C. frutescens*. Campodonico (1983) estimó la polinización cruzada natural de *Capsicum annuum* L. dependiendo de la distancia; 54,9 % para plantas a 1 m de distancia y 11,1 % para plantas a los 10 m. Tankskey (1984) encontró que la polinización cruzada natural de plantas *Capsicum* sp. plantadas a 30 cm de distancia varió entre el 0 % y 91 %, con un promedio

del 27 % al 53 % dependiendo de la línea. En variedades no transgénicas de *C. annuum* L. de la India, Ahmed y Tanki, (1994), encontraron una polinización cruzada natural del 9,7 % en plantas a 5 m. y del 0,28 % a 400 m de distancia. Por otro lado, Kim *et al.* (2009) reportaron un flujo de genes entre 0,73 % y 4,94 % utilizando semillas *C. annuum* no modificadas y modificadas genéticamente, plantadas de 0,5 a 25 m. de distancia, donde la mayoría de los eventos de polinización cruzada ocurrieron en plantas con 2.0 o menos metros de distancia. Mientras que, Justino *et al.* (2018), reportaron un rango de polinización cruzada entre el 0,94 % y 1,56 % en accesiones de *C. annuum*. Las diferencias en las tasas de cruzamiento en las distintas poblaciones de *Capsicum* pueden deberse a variables como la distribución espacial de las plantas, la densidad poblacional de los insectos polinizadores, la época de siembra entre otros (Justino *et al.*, 2018). Sin embargo, los artículos anteriores coinciden en que, a mayor distancia entre plantas, la probabilidad de que ocurra polinización cruzada disminuye drásticamente por lo cual se puede evidenciar que la reproducción de *Capsicum* sp. es principalmente autógama, por lo tanto, la población tendrá altos niveles de endogamia, como fue registrado en este estudio donde se obtuvieron valores de 1,0 para este estimador (Tabla 2). De igual forma, cuando una población obtiene altos niveles de endogamia la heterocigosis tiende a disminuir con el tiempo (Ocampo y Cardona, 2013).

Sin embargo, en poblaciones con reproducción autógama es más importante el efecto de cruzamiento sobre la estructura poblacional que la cantidad de heterocigotos ya que esto ayuda a generar nuevas líneas con las combinaciones de los genes ya existentes, lo que permite que haya lugar a una adaptación continua o a una nueva adaptación (Falconer y Mackay, 2006). Por lo tanto, aunque no se obtuvieron individuos heterocigotos y la endogamia fue alta, *C. annuum* var. *glabriusculum* mostró una alta diversidad la cual se refleja en el número y frecuencia de genotipos obtenidos (17). De esta manera, la población está compuesta principalmente por homocigotos, pero con diferentes características genéticas, este modo le ha permitido mantenerse en el PNR durante años, gracias a la polinización cruzada, aunque esta sea baja (Falconer y Mackay, 2006).

El análisis de agrupamiento realizado en Geneland indicó un $k=3$ como el número más probable de subpoblaciones de *C. annuum* var. *glabriusculum* en el PNR el Vínculo. El grupo 1 está compuesto por los individuos hallados en zonas con sombra donde llega poco la luz solar directa tal y como son los senderos que cruzan el parque y la parte interna del bosque, que posee una cobertura de dosel más madura. El Grupo 2 y el grupo tres contienen individuos que se encontraron principalmente en zonas abiertas donde les llegaba la luz del sol directamente, como lo son alrededor de un humedal y en un claro que solía ser una carretera abandonada. Aunque el 63,6 % de las muestras se encontraron en zonas abiertas, esta especie de ají no muestra preferencia de sitio para crecer ya que tiene una alta

variabilidad fenotípica, lo que varios autores han reportado al poder adaptarse de forma exitosa a diferentes condiciones ambientales, incluyendo la cantidad de luz (Quintero y Barraza, 2009, Hernández-Verdugo *et al.*, 2015). Mezclando la alta variabilidad fenotípica y la alta diversidad genética reportada independientemente de la metodología utilizada (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001, Oyama *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009, Justino *et al.*, 2018) indican que en *C. annuum* var. *glabriusculum* la diversidad genética y la plasticidad fenotípica son 2 recursos independientes que utiliza la especie para sobrevivir y adaptarse a ambientes espacial y temporalmente variables (Hernández-Verdugo *et al.*, 2015).

La información obtenida de los grupos formados en Geneland se utilizó para hallar los *F_{st}* y obtener la matriz de distancia y de identidad genética de Nei. Los subgrupos presentaron una alta identidad genética ya que los valores variaron entre 0,95 y 0,963. De igual forma el dendrograma creado a partir de la matriz de distancia de Nei formó 2 grupos (Fig. 3), el primero compuesto por la agrupación 1 (plantas encontradas en zona cerrada) y el segundo grupo por los agrupamientos 2 y 3 (plantas encontradas en zonas abiertas). Sin embargo, la distancia entre cada grupo es inferior a 0.01, lo que evidencia una vez más que esas subpoblaciones son artificiales y todos los individuos muestreados pertenecen a una misma población.

CONCLUSIONES

De los marcadores microsatélites utilizados Ng8, fue el que presentó el mayor número de alelos, heterocigosidad y PIC, por lo tanto fue el microsatélite más informativo. Sin embargo, a excepción de Bd12, todos los microsatélites utilizados fueron polimórficos, lo que los hace apto para identificar diferencias intraespecíficas. Al comparar los datos obtenidos con estudios anteriores, la población de *C. annuum* var. *glabriusculum* del PNR El Vínculo presenta una mayor diversidad que las obtenidas con variedades domésticas, y una diversidad similar a las reportadas por otros estudios con variedades silvestres de *C. annuum*.

La heterocigosidad observada de cero para todos los marcadores fue natural dada la naturaleza autogámica de la especie; sin embargo, con base a la heterocigosidad esperada la diversidad fue media mientras que el número de genotipos encontrados fue alto. Por consiguiente, la variedad silvestre de *C. annuum* posee una baja heterocigosis, pero una alta diversidad de homocigotos. Lo que lo convierte en un recurso genético valioso que debe ser conservado.

Los valores de distancia e identidad genética de Nei muestran que los individuos evaluados en la población corresponden a un solo grupo, ya que su distancia genética no es suficiente para categorizarlos como poblaciones distintas.

PARTICIPACIÓN DE AUTORES

Mary B. Bonilla-Granja obtuvo y analizó los datos, escribió el manuscrito original, revisó y aprobó el documento final.

Ronald A. Viáfara-Vega conceptualizó y diseñó el experimento, obtuvo y analizó los datos, revisó y aprobó el documento final.

Heiber Cárdenas conceptualizó y diseñó el experimento, revisó y aprobó el documento final, administró y supervisó el proyecto.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, se desea expresar el más sincero agradecimiento a la Universidad del Valle y al Laboratorio de Biología Molecular de la Sección de Genética de dicha universidad, por haber brindado la oportunidad de hacer uso del espacio y los equipos disponibles. De igual manera, se extiende un reconocimiento al PNR El Vínculo por su valiosa colaboración en la recolección de las muestras. Asimismo, es preciso destacar la valiosa orientación brindada por los profesionales de laboratorio, Alexander Ramírez y Gina Colorado, durante el desarrollo de las actividades en el laboratorio. Por último, se extiende un profundo agradecimiento a todas las personas que contribuyeron a la realización de este proyecto, sin cuya colaboración no hubiera sido posible alcanzar los logros obtenidos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

REFERENCIAS

- Abdel-Mawgood, A. L. (2012) DNA Based Techniques for Studying Genetic Diversity. In: Genetic Diversity in Microorganisms, *IntechOpen, Rijeka*, 95-122. <https://doi.org/10.5772/33509>
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L. and Kim, S. C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190–1202. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800155>
- Ahmed, N. and Tanki, M. I. (1994) Effect of planting distance and direction on natural cross pollination and their role in seed production of pepper (*Capsicum annuum*), *Capsicum. Eggplant Newsletter*, 13, 94–96.
- Alvarado-Solano, D.P. and Otero, O. J. T. (2015). Distribución espacial del Bosque Seco Tropical en el Valle

- del Cauca, Colombia. *Acta biol. Colomb.* 20(3):141-153. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.46703>
- Barboza, G. E., García, C. C., Bianchetti, L. B., Romero, M. V. and Scaldaferrro, M. (2022). Monograph of wild and cultivated chili peppers (*Capsicum* L., Solanaceae). *PhytoKeys*, 200, 1–423. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.200.71667>
- Bio-Rad Laboratories. (2012). *Precision Melt Analysis Software Instruction Manual Bio-Rad Laboratories*, Inc. Catalog #184-5025 Bulletin 10014811 Rev A US/EG.
- Campodonico, O. P. (1983). Estimates of natural cross-pollination in serrano pepper (*Capsicum annuum* L.), *Capsicum. Newsletter*, 2, 106–108.
- Cifuentes, H. y Viafara, R. Cardenas (2016). Caracterización molecular de *Capsicum annuum* (solanales, solanaceae), variedad cayena, mediante microsatélites con la técnica HRM. [Tesis de Pregrado]. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- Chase, M. W. and Hills, H. H. (1991) Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 40(2), 215–220. <https://doi.org/10.2307/1222975>
- D'arcy, W. G. and Eshbaugh, W. H. (1974). New world peppers (*Capsicum*: Solanaceae) north of Colombia: a resume. *Baileya*, 19(3), 93-105.
- Doyle, J. and Dickson, E. (1987). Preservation of Plant Samples for DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Taxon*, 36(4), 715-722. <https://doi.org/10.2307/1221122>
- Falconer, D. S. y Mackay, T. F. C. 2006. Introducción a la genética cuantitativa. Cuarta edición. Versión traducida: Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 468.
- Frayling, I.M., Monk, E., Butler, R. (2006). PCR-Based Methods for Mutation Detection. In: Coleman, W.B., Tsongalis, G.J. (eds) *Molecular Diagnostics. Humana Press*. <https://doi.org/10.1385/1-59259-928-1:065>
- Guillot, G., Mortier, F. and Estoup, A. (2005). GENELAND: A program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 712-715. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x>
- González-Jara, P. Moreno-Letelier, A. Fraile, A. Piñero, D. and García-Arenal, F. (2011). Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. *PLoS ONE*, 6(12), e28715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028715>
- Guzmán, F. A. (2007). Desarrollo de una herramienta molecular para el estudio de la diversidad genética de germoplasma del género *Capsicum*. [Tesis de maestría]. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales. Colombia. pp 34.
- Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., Vázquez-Yanes, C. y Oyama, K. (1998). Los parientes silvestres del chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 62, 171-181. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1559>
- Hernández-Verdugo, S., Luna-Reyes, R. and Oyama, K. (2001). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Syst. Evol.*, 226 129–142. <https://doi.org/10.1007/s006060170061>
- Hernández-Verdugo, S., González-Sánchez, R. A., Porras, Flor., Parra-Terraza, S., Valdez-Ortiz, Á., Pacheco-Olvera, A. y López-España, R. G. (2015). Plasticidad fenotípica de poblaciones de chile silvestre (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en respuesta a disponibilidad de luz. *Botanical Sciences*, 93(2), 231-240. <https://doi.org/10.17129/botsoci.237>
- Instituto Alexander Von Humboldt, IAVH. (1997). Caracterización ecológica de cuatro remanentes de Bosque seco Tropical de la región Caribe colombiana. Grupo de Exploraciones Ecológicas Rápidas, IAVH, Villa de Leyva.
- Jeong, H., Jo, Y. D., Park, S. W. and Kang, B.G. (2010). Identification of *Capsicum* species using SNP markers based on high resolution melting analysis. *Genome*, 53(12): 1029–1040. <https://doi.org/10.1139/G10-094>
- Justino, E. V., Fonseca, M. E. N, Ferreira, M. E., Boiteux, L. S. Silva, P. P. and Nascimento, W. M. (2018). Estimate of natural cross-pollination rate of *Capsicum annuum* using a codominant molecular marker associated with fruit pungency. *Genet. Mol. Res.* 17(1). <https://doi.org/10.4238/gmr16039887>
- Kim, C. G., Park, K. W., Lee, B., Kim, D. I., Park, J. Y., Kim, H. J., Park, J. E., An, J. H., Cho, K. H., Jeong, S. C., Choi, K. H., Harn, C. H. and Kim, H. M. (2009). Gene flow from genetically modified to conventional chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 176(3), 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.12.012>
- Kosi Doku, S. (2005). Genetic diversity studies in twenty accessions of hot pepper (*Capsicum* spp L.) in Ghana. Department of nuclear agriculture and radiation processing school of nuclear and allied sciences University of Ghana. Master of Philosophy in Nuclear Agriculture. University of Ghana. Accra, Ghana.
- Lee, J. M., Nahm, S. H., Kim, Y. M. and Kim, B. D. (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(4), 619-627. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1467-x>
- López-España, R. G., López-Hernández, E. R., Hernández-Morales, T., Charrez-Cruz, A., González-Guzmán, Y., Muñoz-Jimarez, N. A. and Ortiz-Quintero, J. A. (2017). Effects of temperature wild chili pepper (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) germination grown under two light conditions. *Acta Agronómica*. 66(1), 69-74. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n1.50662>
- Mcleod, M. J., Guttman, S. I. and Eshbaugh, H. (1982). Early Evolution of Chili Peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36(4), 361-368. <https://doi.org/10.1007/BF02862689>

- Medina, J., Lugo, N., Bonilla, A. y Cortez, D. (2009). Avances del estudio de la variabilidad genética en dos poblaciones silvestres de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriformes: Pimelodidae), en Venezuela. *Actual Biol*, 31(1):118-119.
- Morgante, M. y Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified Microsatellites as Markers in Plant Genetics. *The Plant Journal*, 3, 175-182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00020.x>
- Muñoz F. J. E., Morillo C. A. C. y Morillo C. Y. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronomica*, 57(4), 219-226.
- Nagy, I., Stigel, A., Sasvari, Z., Röder, M. and Ganai, M. (2007). Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome*, 50(7), 668-688. <https://doi.org/10.1139/G07-047>
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Nicolai, M., Cantet, M., Lefebvre, V., Sage-Palloix, A. M. and Palloix, A. (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>
- Ocampo, G. R. y Cardona, C. H. (2013). La endogamia en la producción animal. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 5(2), 463-479. <https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.458>
- Odland, M. L. and Porter, A. M. 1941. A study of natural crossing in pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 38, 585-588.
- Ospina, M. V. (2019). Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos y su asociación con variables clínicas periodontales. Unidad de Investigación Básica Oral UIBO. Universidad del Bosque. p. 114.
- Oyama, K., Hernández-Verdugo, K., Sánchez, C., González-Rodríguez, A., Sánchez-Peña, P., Garzón-Tiznado, J. A. and Casas, A. (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.
- Pacheco-Olvera, A., Hernández-Verdugo, S., Rocha-Ramírez, V., González-Rodríguez, A. and Oyama, K. (2012). Genetic diversity and structure of pepper (*Capsicum annuum* L.) from northwestern Mexico analyzed by microsatellite markers. *Crop Sci*, 52(1), 231-241. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.06.0319>
- Peakall, R. and Smouse P. E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C., Casas, A., Castañeda, S. A., Castillo, A., Cerritos, R., Chassin-Noria, O., Colunga-García, P., Díaz-Jaimes, P., Eguiarte, L., Escalante, A., Espinoza, B., Fleury, A., Flores-Ramírez, S., Fragoso, G., Arturo, G. y Zúñiga, G. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *CONABIO*, México, pp. 437-494.
- Quintero, I. y Barraza, F. (2009). Densidad poblacional y plasticidad fenotípica del ají picante (*Capsicum annuum* L.) c.v. cayene long slim. *Intropica*, 4(1), 55-66.
- Shirasawa, K., Ban, T., Nagata, N. and Murakana, T. (2019). Impact of Genomics on *Capsicum* Breeding. In Ramchiary, N., Kole, C. (eds), *The Capsicum Genome. Compendium of Plant Genomes*. pp. 209-219. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6_13
- Szczecińska, M., Sramkó, G., Wołosz, K. and Sawicki, J. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of the Rare and Endangered Plant Species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2022) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tanksley, S. D. (1984). High rates of cross-pollination in Chile Pepper. *HortScience*, 19(4), 580-582. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.580>
- Toledo-Aguilar, R., López-Sánchez, H., Santacruz-Varela, A., Valadez-Moctezuma, E., López, P. A., Aguilar-Rincón, V. H., González-Hernández, V. A. y Vaquera-Huerta, H. (2016). Characterization of genetic diversity of native 'Ancho' chili populations of Mexico using microsatellite markers. *Chilean Journal of agricultural research*, 76(1), 17-26. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392016000100003>
- Tong, S. Y. C. and Giffard, P. M. (2012). Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *J Clin Microbiol* 50. <https://doi.org/10.1128/jcm.01709-12>
- Torres, G. A. M., Adarve, J. B., Cárdenas, M., Vargas, J. A., Londoño, V., Rivera, K., Home, J., Duque, L. D. and María, A. (2012). Dinámica sucesional de un fragmento de bosque seco tropical del Valle del Cauca. *Colombia. Biota Colombiana*, 13(2), 66-84.
- Varshney, R. K., Graner, A. and Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>
- Wright, S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97-158. <https://doi.org/10.1093/genetics/16.2.97>