



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR  
Y CALIDAD EN CHILE DE AGUA  
(*Capsicum annuum* L.)

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

HECTOR DELÍN REYNOSO

Bajo la supervisión de: Dr. Juan Martínez Solís

Chapingo, Estado de México, mayo de 2023.



**APROBADA**



**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y CALIDAD EN CHILE  
DE AGUA (*Capsicum annuum* L.)**

Tesis realizada por **Hector Delín Reynoso** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

DIRECTOR: \_\_\_\_\_



Dr. JUAN MARTÍNEZ SOLÍS

CODIRECTOR: \_\_\_\_\_



Dr. J. JESÚS MAGDALENO VILLAR

ASESOR: \_\_\_\_\_



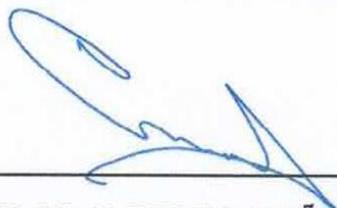
Dra. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

ASESOR: \_\_\_\_\_



Dra. MA TERESA MARTÍNEZ DAMIÁN

LECTOR EXTERNO: \_\_\_\_\_



Dr. CARLOS ALBERTO NUÑEZ COLÍN

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
DEDICATORIAS .....	viii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS .....	x
RESUMEN GENERAL .....	xi
GENERAL ABSTRACT .....	xii
CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1 OBJETIVO .....	3
1.1.1 Objetivos específicos .....	3
1.2 HIPÓTESIS .....	3
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 ORIGEN DEL CHILE .....	4
2.1.1 Descripción botánica .....	4
2.1.2 Requerimientos agroecológicos .....	5
2.1.3 Importancia económica .....	5
2.2 DIVERSIDAD GENÉTICA .....	6
2.2.1 Pérdida de diversidad genética .....	6
2.2.2 Diversidad genética en <i>Capsicum</i> .....	6
2.2.3 Análisis de diversidad genética .....	7
2.3 MARCADORES GENÉTICOS .....	8
2.3.1 Marcadores morfológicos .....	8
2.3.1.1 Criterios para caracterizar mediante marcadores morfológicos .....	9
2.3.2 Marcadores moleculares .....	10
2.3.2.1 RFLPS .....	11
2.3.2.2 RAPDs .....	11
2.3.2.3 AFLPs .....	12

2.3.2.4 SSR .....	12
2.3.2.5 ISSR .....	13
2.4 MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES .....	13
2.5 DESARROLLO DE SEMILLA .....	14
2.5.1 Punto de madurez fisiológica de la semilla .....	15
2.5.2 Índices de madurez fisiológica .....	15
2.5.3 Germinación .....	17
2.5.4 Calidad de la semilla.....	18
2.5.5 Certificación de semillas .....	18
2.5.6 Análisis de las semillas .....	19
2.5.7 Análisis de las principales características de calidad de semilla ...	19
2.6 LITERATURA CITADA.....	21
<b>CAPÍTULO 3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE CHILE ‘DE AGUA’ EN MÉXICO</b> <b>(<i>Capsicum annuum</i> L.).....</b>	<b>28</b>
3.1 RESUMEN .....	28
3.2 ABSTRACT .....	29
3.3 INTRODUCCIÓN .....	30
3.3.1 Origen del chile ‘de agua’ .....	31
3.3.1.1 Descripción morfológica del chile ‘agua’ .....	31
3.3.1.2 Requerimientos agroclimáticos .....	31
3.3.1.3 Plagas y enfermedades.....	32
3.3.1.4 Historia del chile ‘de agua’ .....	33
3.3.1.5 Importancia económica del chile ‘de agua’ .....	34
3.3.2 Importancia de la conservación de la diversidad de los chiles .....	34
3.3.2.1 Estudio de la diversidad genética de chile en México .....	35
3.3.3 Marcadores morfológicos .....	36
3.3.3.1 Análisis estadístico de marcadores morfológicos .....	37
3.3.3.2 Marcadores morfológicos en chile de agua .....	39
3.3.4 Marcadores moleculares.....	41

3.3.4.1 Análisis estadístico de marcadores moleculares .....	43
3.3.4.2 Marcadores moleculares en chile de agua.....	45
3.3.5 Marcadores morfológicos y moleculares .....	46
3.3.6 Otros aspectos para conocer la diversidad de chiles .....	46
3.3.6.1 Aspectos etnobotánicos del chile ‘de agua’ .....	47
3.3.7 Investigaciones de carácter agronómico en chile ‘de agua’ .....	48
3.3.7.1 Calidad de semilla en chile ‘de agua’.....	48
3.3.7.2 Calidad del fruto de chile ‘de agua’.....	49
3.3.7.3 Demanda nutrimental .....	50
3.3.7.4 Etiología de la marchitez del chile ‘de agua’ .....	51
3.3.7.5 Poda en chile ‘de agua’ .....	51
3.4 CONCLUSIONES .....	51
3.5 LITERATURA CITADA.....	52
<b>CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN CHILE DE AGUA (<i>Capsicum annuum</i> L.) .....</b>	<b>60</b>
4.1 RESUMEN .....	60
4.2 ABSTRACT .....	61
4.3 INTRODUCCIÓN .....	62
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	63
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	66
4.5.1 Caracterización morfológica.....	66
4.5.2 Caracterización molecular .....	70
4.5.3 Caracterización morfológica y molecular .....	73
4.6 CONCLUSIONES .....	75
4.7 LITERATURA CITADA.....	75
<b>CAPITULO 5. CALIDAD DE SEMILLA DE CHILE ‘DE AGUA’ (<i>Capsicum annuum</i> L.) EXTRAÍDA DE FRUTOS CON DIFERENTE GRADO DE MADUREZ .....</b>	<b>79</b>
5.1 RESUMEN .....	79
5.2 ABSTRACT .....	80

<b>5.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>81</b>
<b>5.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>82</b>
<b>5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b>5.6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>94</b>
<b>5.7 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Secuencia y temperatura de alineamiento de 18 iniciadores ISSR. ....	64
<b>Cuadro 2.</b> Grupos de las accesiones de ‘chile de agua’ obtenidos mediante la caracterización morfológica utilizando análisis multivariados de agrupamiento y discriminante. ....	68
<b>Cuadro 3.</b> Descriptiva de marcadores ISSR usados para la obtención de perfiles moleculares de 55 accesiones de ‘chile de agua’. ....	71
<b>Cuadro 4.</b> Subgrupos generados por la caracterización morfológica y molecular de 55 accesiones de chile de agua. ....	73
<b>Cuadro 5.</b> Cuadrados medios del análisis de varianza para ocho parámetros de calidad de semilla de chile ‘de agua’. ....	84
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de medias de ocho parámetros de calidad de semilla de frutos de chile ‘de agua’ cosechados a diferentes días después de antesis. ....	86
<b>Cuadro 7.</b> Comparación de medias de peso de semilla (PDS), porcentaje de germinación (GER) y plántulas normales (PN) en semillas de 50 accesiones de chile ‘de agua’. ....	88
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias del índice de velocidad de germinación (IVG), longitud de raíz (LR) y parte aérea (LA) en semillas de 50 accesiones de chile ‘de agua’. ....	89
<b>Cuadro 9.</b> Comparación de medias de peso fresco (PF) y seco (PS) de plántulas de 50 accesiones de chile ‘de agua’.....	90
<b>Cuadro 10.</b> Matriz de coeficiente de correlación Pearson entre parámetros de calidad de semilla en 50 accesiones de chile ‘de agua’ cosechadas a diferentes días después de antesis.....	91
<b>Cuadro 11.</b> Vectores y valores propios de tres componentes principales en los parámetros de calidad evaluados en semilla de 50 accesiones de chile ‘de agua’. ....	92

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendrograma jerárquico de caracteres morfológicos de *Capsicum annuum*, derivado de distancias euclidianas y algoritmo de mínima varianza de Ward. C: colecta..... 67
- Figura 2.** Representación gráfica de variables discriminantes (VD1 y VD2) de cuatro grupos de accesiones de chile de agua de acuerdo con sus características morfológicas. .... 69
- Figura 3.** Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares derivado del índice de disimilitud de Jaccard y método de agrupamiento UPGMA para 55 colectas de 'chile de agua'. .... 72
- Figura 4.** Correlación entre las matrices de distancia del análisis molecular y morfológico..... 74
- Figura 5.** Biplot del ACP para los tres componentes principales de parámetros de calidad de semilla en 50 accesiones de chile 'de agua'. .... 93

## **DEDICATORIAS**

A Dios por permitirme el maravilloso regalo de la vida.

A mis padres Ranulfo Delín Alcántara, Cliselía Reynoso Vichique por su apoyo, sabios consejos y amor incondicional que me demuestran.

A mi esposa Griselda por su apoyo y amor incondicional durante todos estos años.

A mis hermanos Silvano, Alicia, Patricia, Gisela, Rocío, Matilde, María Celia, Leonor, Edith Araceli, Pablo Manuel y Elizabeth por el cariño y el apoyo recibido durante todos estos años.

A mis sobrinos, familiares y conocidos por el cariño y amistad que me brindan.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, departamento de Fitotecnia, y al Instituto de Horticultura por la oportunidad de realizar estos estudios.

Al Dr. Juan Martínez Solís, por su valiosa dirección, apoyo y aporte de experiencia en la realización de este trabajo.

A la Dra. Margarita Gisela Peña por su valiosa asesoría y revisión de este trabajo.

A la Dra. Ma Teresa Martínez Damián por valioso apoyo y aporte en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. J. Jesús Magdaleno Villar por su valioso apoyo en la revisión y desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Alberto Núñez Colín por su valioso apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez por sus aportes para la mejora de este trabajo.

A la T. M. E. A. S. Ma. Inés Acosta Martínez por el apoyo otorgado en la fase experimental de este trabajo.

Al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por las enseñanzas y apoyo en el laboratorio de marcadores moleculares.

A Griselda y Luis Alberto por el apoyo otorgado en el desarrollo de la fase experimental de este trabajo.

A mis compañeros de posgrado por los excelentes momentos. A todas las personas que me apoyaron en todo momento para la realización de este trabajo.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Hector Delín Reynoso nació el 7 de febrero de 1990 en la ciudad de Orizaba, Veracruz. Realizó sus estudios de licenciatura en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo en la generación 2006-2013, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. Hasta enero de 2015 laboró en Fertilizantes y Productos Agroquímicos S.A. de C.V. como asesor técnico de ventas. Posteriormente laboró en Productos y Procesos Sustentables A.C. como auditor en certificaciones sustentables hasta octubre de 2015. Hasta enero de 2017 laboró como asesor en certificaciones sustentables de café para las empresas Agroindustrias de México S.A. de C.V. y Nespresso. En el 2017 ingresó al Posgrado de Horticultura del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo donde realizó sus estudios de Maestría en Ciencias Horticultura, posteriormente en el 2018 realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias en Horticultura en la misma institución.

## RESUMEN GENERAL

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y CALIDAD DE SEMILLA EN CHILE DE AGUA (*Capsicum annuum* L.)

El chile de agua es un cultivo importante en los Valles Centrales de Oaxaca y los sistemas agrícolas tradicionales han posibilitado su variabilidad morfológica. Para mejoramiento genético o conservar estos recursos, es indispensable conocer su variabilidad genética. Asimismo, para la reproducción y conservación de este chile se requiere buena calidad de semilla, por lo que es necesario conocer el momento oportuno de cosecha que la garantice. El objetivo del presente estudio fue conocer la variabilidad genética de 55 accesiones de chile 'de agua' así como el momento oportuno de cosecha de semilla. Las accesiones se establecieron bajo invernadero en sistema hidropónico y se realizó su caracterización morfológica y molecular. En el primer tipo de caracterización se utilizaron descriptores para *Capsicum* del IPGRI, mientras que en la segunda se utilizaron 18 marcadores ISSR's. A su vez, se cosecharon frutos a los 55, 65 y 75 días después de antesis (dda) y se hicieron pruebas de germinación de semilla. Los análisis multivariados diferenciaron cuatro grupos con los descriptores morfológicos y cinco con marcadores moleculares, estos grupos no estuvieron asociados con el origen de las accesiones. Los resultados muestran la existencia de una importante variabilidad genética en chile 'de agua'. Las accesiones del grupo tres de la caracterización morfológica presentaron características deseables por los consumidores, se podría comenzar un programa de mejoramiento genético con este grupo. A los 65 dda la semilla de chile 'de agua' obtuvo la mejor calidad fisiológica.

**Palabras clave:** marcadores moleculares, caracteres morfológicos, germinación

## GENERAL ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SEED QUALITY IN 'DE AGUA' CHILI (*Capsicum annuum* L.)

The 'de agua' chili is an important crop in the Central Valleys of Oaxaca where the traditional agricultural systems have preserved its morphological variability. For genetic breeding or conservation of these resources it is essential to know their genetic variability. Furthermore, for the reproduction and conservation of this chili is required good quality seed, so it is necessary to know the correct harvest time to guarantee quality seed. The objective of this study was to know the genetic variability of 55 accessions of 'de agua' chili as well as seed harvest opportunity. The accessions were established under a greenhouse in a hydroponic system and a morphological and molecular characterization was carried out. In the first study descriptors for *Capsicum* generated by IPGRI were registered, while in the second, 18 ISSR's markers were used. In turn, fruits were harvested at 55, 65 and 75 days after anthesis (daa) and standard germination seed tests were carried out. The multivariate analyzes differentiated four groups with morphological descriptors and five with molecular markers, these groups were not associated with the origin of the accessions. The results show the existence of an important genetic variability in 'de agua' chili. The group three accessions of the morphological characterization presented desirable characteristics for consumers, a genetic breeding program could be started with this group. At 65 daa the 'de agua' chili seed presented the highest physiological quality seed.

**Keywords:** molecular markers, morphological characters, germination

## CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile es uno de los cultivos más importantes en el mundo, México se destacó como el segundo productor a nivel mundial solo detrás de China (SIAP, 2018). En el país existe amplia variabilidad genética y se observan diversidad de formas y tamaños de planta, flores y fruto en el género *Capsicum* especialmente en la especie *C. annuum* por tal motivo México es considerado como su centro de domesticación y distribución (Aguilar et al., 2010; Aguirre et al., 2017).

La riqueza genética de chiles en el país se ha dado en gran medida por la diversidad de relieves, climas, suelos y la persistencia de los sistemas tradicionales de cultivo (Latournerie et al., 2001). Se tiene conocimiento que en las especies de *Capsicum*, los morfotipos son los principales niveles de diversidad, pero también existe la diversidad intra-morfotipos que puede servir para fines de uso y conservación (Walsh & Hoot, 2001; Castellón-Martínez et al., 2006). Para el manejo eficiente de estos recursos fitogenéticos o su conservación es necesario conocer la variabilidad genética tanto de variedades silvestres como las cultivadas de forma tradicional y las que se generan a partir de mejoramiento genético (Latournerie et al., 2001).

Los chiles más cultivados a nivel nacional son el jalapeño, ancho, serrano, mirasol y pimiento; representando del 70 a 80 % de la producción nacional (Aguilar et al., 2010; Aguirre et al., 2017). Sin embargo, existen chiles criollos de importancia para determinadas regiones del país, tal es el caso del chile 'de agua' considerado endémico de los Valles Centrales de Oaxaca. Este tipo de chile ha conservado variabilidad de tamaños, formas y color de fruto debido al cultivo tradicional que los productores llevan a cabo (López, 2007; Martínez-Sánchez et al., 2010).

Para explorar la variabilidad genética de los chiles existentes en el país se han llevado a cabo caracterizaciones de manera *in situ* y *ex situ*, ésta última mediante colectas (Baltazar, 1997; Hernández-Verdugo et al., 2014; Toledo-Aguilar et al., 2016). Los primeros tipos de caracterización fueron realizados con marcadores morfológicos y en años recientes se incorporaron marcadores moleculares (Votava et al., 2005; Bobadilla-Larios et al., 2017). Sin embargo, por la alta diversidad de chiles, así como el extenso territorio mexicano estos esfuerzos de caracterización todavía son insuficientes y quedan morfotipos por investigar (Perez-Castañeda et al., 2015).

En Chile 'de agua' los estudios enfocados a su caracterización morfológica o molecular exploraron un número limitado de accesiones lo que dificulta conocer su variabilidad genética de forma acertada (Aguilar-Melendez et al., 2009; Martínez-Sánchez et al., 2010; Castellón-Martínez et al., 2014; Taitano et al., 2019). Es indispensable aumentar el número de accesiones, así como diferentes lugares de colecta para estimar de manera correcta la variabilidad genética en este tipo de Chile.

Para tener rendimientos altos en la producción agrícola se necesita semilla de calidad genética y fisiológica; en este sentido, es necesario cosechar la semilla en el momento de su madurez fisiológica (Criollo & Upegui, 2005; Dias et al., 2006; Ayala et al., 2014). Al respecto, en el cultivo de Chile se han realizado diversos estudios para establecer la época adecuada de cosecha de semilla conforme a la maduración del fruto, ya sea mediante el cambio de color o días después de anthesis (Espíndola & Smirdele, 2014; García-Tierrablanca et al., 2015; Ruiz & Parera, 2017). En el Chile 'de agua' los productores seleccionan su propia semilla dentro de sus parcelas, por lo que para ellos es imprescindible cosechar los frutos cuando la semilla presente la mejor calidad fisiológica; sin embargo, no se ha realizado ninguna investigación para definirla.

## **1.1 OBJETIVO**

Determinar la variabilidad genética del chile de agua mediante su caracterización morfológica y molecular, así como establecer el momento adecuado de cosecha para obtener semilla de calidad.

### **1.1.1 Objetivos específicos**

Identificar la variabilidad genética del chile 'de agua' mediante descriptores morfológicos para *Capsicum*.

Definir la variabilidad genética del chile 'de agua' mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR.

Establecer la correlación entre los dos tipos de caracterización en chile 'de agua'.

Observar la tendencia en parámetros de calidad física y fisiológica de semilla extraída de frutos de 'chile de agua', cosechados en diferentes días después de antesis (dda).

## **1.2 HIPÓTESIS**

Existe variabilidad genética entre las accesiones de chile de agua y mediante la caracterización morfológica y molecular se podrá identificar.

La calidad fisiológica de la semilla de chile de agua mejora conforme aumentan los dda antes de la cosecha.

## **CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 ORIGEN DEL CHILE**

Las especies del género *Capsicum* son originarias de América (Nuez et al., 2003), su origen botánico es en América del Sur, específicamente en las zonas tropicales y subtropicales de países como Bolivia y Perú, de donde se propagó al resto de Sudamérica y América Central (Namesny, 2006; Bojacá et al., 2012). Dentro del género *Capsicum* se distinguen cinco especies domesticadas: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. annuum*; y aproximadamente 25 silvestres y semicultivadas (Aguilar et al., 2010). México es considerado centro de domesticación de la especie *Capsicum annuum* por lo que existen diversidad de formas y tamaños de plantas y frutos de esta especie (Namesny, 2006). El Chile 'de agua' (*Capsicum annuum*) es originario y endémico de los Valles Centrales de Oaxaca (López, 2007).

#### **2.1.2 Descripción botánica**

El Chile 'de agua' es una planta anual, los tallos son erguidos y se bifurcan de manera dicotómica, con altura promedio de 60 cm. La raíz es pivotante con gran número de raíces secundarias y longitud promedio de 27 cm. Las hojas son alternas y ovaladas, con ápice acuminado, borde liso, base atenuada, pinnadamente nervadas, glabras en haz y envés. La planta de Chile 'de agua' es hermafrodita y su fecundación autógama (Nuez et al., 2003; López, 2007). Las flores son solitarias en cada nudo, completas y perfectas. El fruto es una baya que presenta una estructura hueca con forma de capsula cónica alargada está constituida por un pericarpio grueso y un tejido placentario en donde se unen las semillas. El tamaño promedio del fruto es de 15 cm de largo y 6 cm de diámetro en su base. El fruto cuando este inmaduro es de color verde-amarillo a verde-oscuro y cuando madura es de un rojo intenso brillante (Zapata et al., 1992; López, 2007).

Las semillas son redondeadas, aplanadas levemente reniformes, lisas y sin brillo, insertadas en una placenta cónica que es una prolongación del pedúnculo y son de color blanco en fruto fresco mientras que en fruto seco son amarillentas. Su diámetro promedio es de 4 mm (Nuez et al., 2003; López, 2007; Bojacá et al., 2012).

### **2.1.3 Requerimientos agroecológicos**

En general los chiles se cultivan a altitudes de 0 hasta 2,300 msnm, según la variedad; tienen buen desarrollo a temperaturas que van de 18 a 30 °C. Para completar su ciclo vegetativo necesitan de 600 a 1200 mm de precipitación (Orellana et al., 2012). Los chiles necesitan iluminación intensa, de lo contrario el ciclo vegetativo se alarga, son plantas de día corto y requieren una humedad relativa de 50 a 70 % (Ruiz et al., 2013). En el caso específico del chile 'de agua' tiene un extenso rango de adaptación ya que se cultiva en diferentes distritos de los Valles Centrales de Oaxaca, principalmente en los suelos del fondo del Valle, clasificados dentro de la serie Feozem, bajo un clima semicálido subhúmedo y semicálido seco (López, 2007).

### **2.1.4 Importancia económica**

Por el valor económico y superficie sembrada *C. annuum* es la especie de chile más importante a nivel mundial. En México este cultivo se produce en todos los estados, desde el nivel del mar, hasta los 2500 m de altura. Debido a que el país es el centro de domesticación de *C. annuum*, la especie presenta una gran diversidad de tipos. El cultivo de chile en México es de suma importancia por el valor de su producción (Lesur, 2006; Aguilar et al., 2010; Aguirre-Mancilla et al., 2017).

En el 2021 en México se sembraron 147, 800 hectáreas de chile y se tuvo una producción de alrededor de tres millones de toneladas de producto y los ingresos obtenidos fueron de 30 mil millones de pesos. Respecto al chile 'de agua' en los Valles Centrales de Oaxaca se cultivaron 263 ha, con una producción total de 2, 072 toneladas y los ingresos fueron de 35 millones de pesos (SIAP, 2023).

## 2.2 DIVERSIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población, entre las poblaciones dentro de una especie y entre especies (Piñero et al., 2008; Klug et al., 2013).

Los patrones de diversidad genética de las plantas cultivadas resultan de la interacción de los factores principales siguientes: mutación, migración, recombinación, selección y deriva genética. Los primeros tres contribuyen de manera positiva al aumento de la variación mientras que, los últimos dos, la disminuyen (Hernández-Villareal, 2013).

### 2.2.1 Pérdida de diversidad genética

La pérdida de diversidad genética en especies silvestres ésta asociada con la reducción del tamaño poblacional, esto se puede deber a una recolección excesiva y pérdida de hábitat. En plantas domesticadas la reducción de la diversidad genética se puede atribuir a los cambios en la práctica agrícola y a las demandas de los consumidores. Las nuevas técnicas agrícolas han incrementado el nivel de producción, pero han dado lugar a mayor uniformidad genética. Cuando los agricultores cambian a una nueva variedad vegetal, abandonan el cultivo de muchos tipos locales, que pueden desaparecer sino se hacen esfuerzos para preservarlos (Klug et al., 2013)

### 2.2.2 Diversidad genética en *Capsicum*

El centro de origen de *Capsicum* spp es América del Sur. El número de especies que comprende el género *Capsicum* es de 20 a 30 y de ellas solo son cinco las especies domesticadas: *C. annuum* var. *annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. baccatum* var. *pendulum*, y la semidomesticada *C. frutescens*, y la silvestre *C. annuum* var. *Glabriusculum* (Votava et al., 2005; Castañon Nájera et al., 2008).

Dentro de estas especies, *C. annuum* es el chile con mayor variación en tamaño, forma y color de sus frutos, además México es considerado como su centro de domesticación y diversificación. La riqueza constituida por la diversidad genética del chile se encuentra distribuida a todo lo largo y ancho de México, tanto en formas cultivadas como silvestres (Aguilar et al., 2010).

### **2.2.3 Análisis de diversidad genética**

El estudio de la diversidad genética en plantas es un componente de suma importancia de la genética, la conservación, el mejoramiento y la evolución de las plantas (Peterson et al., 2014). Permite a los fitomejoradores la obtención de variedades nuevas y mejoradas con rasgos agronómicos atractivos, como rasgos deseables por los agricultores como alto rendimiento y frutos grandes o por los fitomejoradores como resistencia a plagas, enfermedades y fotosensibilidad (Govindaraj et al., 2015). Los avances en marcadores moleculares y la secuenciación del genoma brindan una excelente oportunidad para caracterizar y evaluar la diversidad genética de una gran colección de germoplasma (Liu et al., 2015). En el estudio de la evolución de las plantas y la genómica comparativa, la evaluación de la diversidad genética es muy útil para distinguir la estructura de diferentes poblaciones (Baloch et al., 2017).

Además, para diseñar cualquier estrategia de conservación, la evaluación de la diversidad genética de los cultivos utilizando diferentes marcadores es esencial para el uso sostenible del germoplasma vegetal con fines de mejora y la estrategia de conservación (Dida, 2022). Por lo que el conocimiento sobre la estructura de la población y las relaciones genéticas de cualquier planta es importante para la conservación y utilización eficiente de estos genotipos en futuros programas de mejoramiento (Dida, 2022). El análisis de la diversidad genética entre especies y dentro y entre poblaciones de las mismas implica habitualmente el uso de diferentes marcadores genéticos. Se han utilizado diferentes marcadores genéticos para determinar la diversidad genética y clasificar el material genético con gran efectividad (Dida, 2022).

Los marcadores pueden tener los mismos modos de herencia que otras características, como la herencia dominante/recesiva o codominante (Dida, 2022).

## **2.3 MARCADORES GENÉTICOS**

Se clasifican en tres tipos: los morfológicos, bioquímicos y los de ADN/moleculares. En primer lugar, la caracterización e identificación tradicional de variedades se basa en el empleo de marcadores morfológicos y/o agronómicos (Azofeifa-Delgado, 2006; Dida, 2022).

### **2.3.1 Marcadores morfológicos**

Uno de los aspectos básicos en la caracterización de especies es la descripción de una serie de colecciones desde la perspectiva de sus atributos morfológicos. Para cuantificar la variabilidad genética o generar algunos estimadores de ella es necesario conocer el origen geográfico de la colección y las fuentes de diversidad (Hidalgo, 2003). Se espera que con la caracterización morfológica se conozca el nivel de variabilidad de la colección, la estructura genética de cada una de las poblaciones (accesiones) y las herramientas metodológicas adecuadas. La caracterización morfológica se puede hacer *in situ* o *ex situ* (Hidalgo, 2003)

La caracterización morfológica de recursos fitogenéticos es la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las plantas. Las características morfológicas se utilizan para estudiar la variabilidad genética, para identificar plantas y para conservar los recursos genéticos (Hernández-Villareal, 2013). Por lo tanto, la caracterización es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación (Hernández-Villareal, 2013; Dida, 2022).

En relación con el fenotipo, los caracteres que forman parte de éste corresponden en su gran mayoría a la descripción morfológica de la planta y su arquitectura. Estos caracteres se denominan descriptores o marcadores morfológicos. permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos (IPGRI, 1995).

Por lo común se utilizan caracteres altamente heredables, que son fácilmente detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes (IPGRI, 1995). Además, pueden abarcar un número limitado de caracteres adicionales que son deseables según el consenso de los usuarios de un cultivo en particular (IPGRI, 1995). Se pueden agrupar en los tipos que aparecen a continuación:

**Botánicos-taxonómicos:** son marcadores que describen e identifican a la especie y son comunes a todos los individuos de esa especie (Hidalgo, 2003).

**Morfoagronómicos:** Corresponden a los marcadores que son relevantes en la utilización de las especies cultivadas. Pueden ser de tipo cualitativo o cuantitativo, e incluyen algunos de los caracteres botánicos-taxonómicos más otros que no necesariamente identifican la especie, pero que son importantes desde el punto de vista de necesidades agronómicas, de mejoramiento genético, y de mercadeo y consumo (Hidalgo, 2003).

**Evaluativos:** Esta porción de la variabilidad sólo se expresa como respuesta a estímulos ambientales bióticos (plagas y enfermedades) o abióticos (estrés por temperatura, agua, nutrientes). En general, la respuesta se expresa en características de tipo cualitativo (Hidalgo, 2003).

### **2.3.1.1 Criterios para caracterizar mediante marcadores morfológicos**

Para realizar la caracterización primeramente es necesario el conocimiento pleno de la especie y el establecimiento del objetivo de la caracterización. Es necesario también conocer la variabilidad global de la colección mediante una siembra previa la cual permitirá homogeneizar las accesiones de acuerdo con sus morfotipos (Hernandez-Villareal 2013).

Para medir la variabilidad es necesario utilizar descriptores discriminatorios y establecer el experimento con un mínimo de cinco plantas por accesión en lotes homogéneos en dos replicaciones, de este modo se obtendrá mejor y más información en el análisis estadístico (Hernandez-Villareal 2013).

Los marcadores morfológicos tienen varias limitaciones, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos; por ejemplo, la presencia o ausencia de espinas en los cítricos (Azofeifa-Delgado, 2006). Frecuentemente sólo es posible evaluar este tipo de marcadores a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su estado adulto (Azofeifa-Delgado, 2006; Dida, 2022).

### **2.3.2 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares pueden ser dominantes o co-dominantes, se comportan de manera estable, carecen de efectos pleiotropicos, tienen mayor polimorfismo, pueden ser evaluados desde cualquier etapa de desarrollo de la planta y no son afectados por el ambiente (Pérez-Castañeda et al., 2015). Además, permiten caracterizar genomas de diferentes organismos, detectar y aislar genes y diferenciar organismos relacionados genéticamente (Alcántara, 2007; Pérez-Castañeda et al., 2015). Un marcador molecular se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía. Dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de tres tipos: bioquímicos, proteínas (principalmente isoenzimas) y los marcadores de ADN (Alcántara, 2007).

Las isoenzimas, o aloenzimas, son las proteínas más ampliamente usadas como marcadores moleculares y éstas fueron los primeros marcadores moleculares usados en genética de plantas (Alcántara, 2007).

Los marcadores moleculares de ADN se dividen en dos grupos, dependiendo si la detección de los polimorfismos se realiza mediante hibridaciones o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre los primeros los más relevantes son los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Alcántara, 2007). Dentro de los marcadores moleculares basados en la PCR tenemos: la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), las repeticiones de secuencias simples (SSR o microsatélites),

las repeticiones entre las secuencias simples (ISSR), entre otros tipos de marcadores (Ríos et al., 2009; Jonah et al., 2011; Riaz et al., 2020).

#### **2.3.2.1 RFLPS**

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) son una de las herramientas más importantes para el mapeo del genoma de plantas y se clasifican como marcadores basados en hibridación. Los RFLP implican la extracción de ADN genómico seguida de su digestión con enzimas de restricción específicas que cortan el ADN en fragmentos. Se produce cuando hay una variación en los sitios de escisión de las enzimas de restricción, que surge debido a sustituciones, inserciones, eliminaciones o translocaciones de bases en el ADN genómico (Jonah et al., 2011; Dida, 2022).

Las ventajas de los RFLP son su alta reproducibilidad, gran abundancia genómica, herencia codominante, asociación con un rasgo de interés y buena transferibilidad, sin embargo, requieren alta cantidad y calidad de ADN molde, reactivos tóxicos radiactivos y técnicos altamente calificados (Jonah et al., 2011; Dida, 2022).

#### **2.3.2.2 RAPDs**

El ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs-Random Amplified Polymorphic DNA) está basado en la PCR para amplificar el ADN genómico con un cebador único de una secuencia de nucleótidos arbitraria, generalmente de 10 pb. Los cebadores RAPD detectan polimorfismos sin especificidad de especie ni se requiere información previa sobre la secuencia, además, el polimorfismo detectado se utiliza para construir mapas genéticos (Jonah et al., 2011; Riaz et al., 2020). Los polimorfismos RAPD surgen cuando las regiones genómicas varían en presencia o ausencia de sitios de hibridación de cebadores complementarios debido a la inserción o eliminación entre dos sitios de cebado, lo que da fragmentos de varias longitudes (Jonah et al., 2011). Las ventajas de los RAPD es que son rápidos de ensayar y eficientes para el análisis de diversidad y la construcción de mapas de ligamiento genético; no hay necesidad de alta calidad y cantidad de plantilla de ADN.

Sin embargo, requieren de optimizar el experimento con el fin de poder reproducir los resultados (Jonah et al., 2011; Riaz et al., 2020).

### **2.3.2.3 AFLPs**

Los polimorfismos amplificados de fragmentos de diferente longitud (AFLP) son marcadores híbridos basados en RFLP y PCR para la detección rápida de estudios de diversidad genética y variación intraespecífica (Riaz et al., 2020). Es una técnica de identificación de ADN genómico de cualquier origen o complejidad y genera rápidamente una serie de fragmentaciones del ADN genómico utilizando enzimas de restricción específicas (Dida, 2022). La fortaleza de los AFLP incluye su alta abundancia genómica, generando datos altamente confiables y reproducibles, siendo altamente polimórficos; generando muchas bandas informativas por reacción, se necesita una pequeña cantidad de plantilla de ADN y el hecho de que no se requiere información de secuencia para la construcción del cebador (Dida, 2022). Las posibles razones de los polimorfismos AFLP son: variaciones de secuencia en un sitio de restricción, inserciones o deleciones dentro de un fragmento amplificado y diferencias en la secuencia de nucleótidos inmediatamente adyacente al sitio de restricción (Dida, 2022). Los AFLP se han utilizado para la evaluación de la diversidad genética, la toma de huellas genéticas del ADN, la construcción de mapas de ligamiento y para localizar rasgos de interés (Riaz et al., 2020; Dida, 2022).

### **2.3.2.4 SSR**

Los SSR o microsatélites son secuencias muy cortas (1 a 6 pb) que tienen alto grado de repetición y ocurren en varios miles de loci en el genoma nuclear. Los microsatélites también están presentes en el cloroplasto y las mitocondrias, varios investigadores también han identificado la presencia de marcadores SSR en genes que codifican proteínas y etiquetas de secuencia expresada (Alcántara, 2007). Los microsatélites pueden ser de mono a hexanucleótidos, y contienen un bajo grado de repetición por locus y son altamente polimórficos. La mayor variabilidad de los SSR entre organismos estrechamente relacionados los convierte en una opción

informativa y popular de marcadores para una amplia gama de aplicaciones en biología evolutiva y de poblaciones, que incluyen la estimación de la diversidad genética, el estudio de la estructura de la población y el flujo de genes, y el desarrollo de mapeo de genes (Alcántara, 2007).

Estos marcadores tienen la ventaja de ser abundantes con cobertura genómica uniforme, enorme diversidad alélica, hipervariabilidad, herencia codominante, facilidad de detección mediante PCR utilizando un par de cebadores flanqueantes y la necesidad de solo una pequeña cantidad de ADN molde (Alcántara, 2007; Ramalho et al., 2016).

#### **2.3.2.5 ISSR**

Las intersecuencias simples repetidas (ISSR) consisten en la amplificación de segmentos de ADN presentes a una distancia cercana entre dos regiones repetidas de microsatélites idénticas orientadas en direcciones opuestas (Lee, 2019). La técnica utiliza microsatélites, generalmente de 16 a 25 pb de longitud. Son marcadores dominantes por lo que no diferencian entre los genomas de homocigotos y heterocigotos. Estos marcadores en su mayoría, producen un gran número de bandas polimórficas son fáciles de montar, altamente repetibles y existen primers universales para plantas (Lee, 2019). Este tipo de marcadores se han utilizado comúnmente para la evaluación de la variabilidad genética, estudios taxonómicos, análisis filogenéticos y huellas genéticas de ADN de cultivos hortícolas (Lee, 2019; Riaz et al., 2020).

### **2.4 MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES**

Los dos tipos de marcadores frecuentemente no nos dan resultados concordantes porque los patrones de la variación para marcadores moleculares generalmente están más influidos por la deriva génica y el flujo génico, y los marcadores morfológicos están más influidos por selección en general como motor evolutivo (Monteros et al., 2018). Ambos tipos de marcadores se complementan ya que pueden dar mayor información sobre la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones y especies para la conservación y el manejo de los recursos genéticos,

por lo que la mejor estrategia es usar los dos métodos (Marín-Montes et al., 2016; Monteros et al., 2018; Taitano et al., 2019).

## **2.5 DESARROLLO DE SEMILLA**

La semilla desde el punto de vista botánico es un óvulo maduro, encerrado dentro del ovario o fruto y consta de tres partes esenciales: el embrión, el endospermo y las cubiertas (Arriaga 2000). El embrión resulta de la unión durante la fertilización del gameto femenino por el gameto masculino. Su estructura es un eje con puntos de crecimiento en ambos extremos (tallo y raíz) y una o más hojas seminales o cotiledones fijadas en el eje embrionario. Los tejidos de almacenamiento pueden estar formados por las cubiertas mismas, por los restos de la nucela y, a veces, por parte del fruto (Arriaga 2000). Las cubiertas de la semilla proporcionan protección mecánica al embrión, haciendo posible su manejo sin dañarlo y permite su almacenamiento por periodos largos y transporte a largas distancias (Arriaga 2000)

La formación de la semilla comienza con el proceso de fecundación mediante la unión de los gametos. Después de la fecundación o doble fertilización, el ovulo sufre una serie de modificaciones, tanto en sus funciones, como en la fisiología, originando la semilla que alcanza su máximo tamaño y peso seco (Velásquez & Tapia, 2008). Desde la fecundación hasta la maduración de las semillas se produce un conjunto de procesos conocidos en sus cambios morfológicos. En la semilla madura el embrión detiene su crecimiento, las sustancias de reserva alcanzan su máxima cantidad y las estructuras de protección están perfectamente desarrolladas (Gaviola, 2020).

Las fases de desarrollo de la semilla se pueden dividir en las siguientes fases: división celular, depósito de reservas, maduración y fase de desecación (Weber et al., 2005). División celular: Presenta alta tasa de divisiones nucleares y por la formación concomitante de paredes celulares. Hay aumento del número de células del embrión (Azcón & Talón, 2008). Expansión celular y depósito de reservas: El crecimiento por división desaparece y el crecimiento es debido a la elongación

celular (Azcón & Talón, 2008). En las semillas endospermicas las reservas se depositan fuera del embrión formando el endospermo (Thomson, 1979).

**Maduración:** El peso fresco de la semilla disminuye debido a la pérdida de agua, la tolerancia a la desecación y la ausencia de alteraciones en peso seco. Las semillas maduran dentro del fruto, después de la maduración del fruto, la semilla entra generalmente en letargo por un tiempo más o menos largo (Bidwell, 1993).

**Desecación:** Las semillas ortodoxas tienen una pérdida importante de agua. Las estructuras celulares de la semilla no se deterioran, porque adquieren tolerancia a la desecación (Azcón y Talón, 2008).

Finalizado el desarrollo de las semillas sobre la planta, permanecen en un estado de reposo hasta que se dan las condiciones favorables para su germinación. Este estado puede venir determinado por la existencia de factores que actúan desde la propia semilla no permitiendo su geminación o por la existencia de condiciones ambientales desfavorables (Villamil & García, 1998). En el primer caso la semilla presenta dormición y en el segundo la semilla se encuentra en un estado de quiescencia (Villamil & García, 1998).

### **2.5.1 Punto de madurez fisiológica de la semilla**

Sucede generalmente cuando la semilla alcanza la mayor acumulación de materia seca, tamaño, disminución de humedad y corresponde con el fin del periodo de acumulación de reservas (Popinigis, 1985). La necesidad de conocer la madurez fisiológica radica en que en este punto se da el máximo vigor y germinación de la semilla, además de tolerancia a condiciones adversas (Carvalho & Nakagawa, 2000, Ayala-Villegas et al., 2014). Una vez pasado este punto la germinación y vigor se reducen debido a procesos de deterioro (Moo-Muñoz et al., 2016).

### **2.5.2 Índices de madurez fisiológica**

**Acumulación de materia seca:** En general para la mayoría de las semillas cuando alcanzan el máximo peso de materia seca se obtiene el mayor vigor y poder

germinativo, en este punto la semilla mantiene adecuadamente todas sus funciones fisiológicas propias (Criollo & Upegui, 2005).

Contenido de humedad: Al momento de la fecundación el óvulo contiene más del 80 % de humedad. Conforme la semilla se forma, la humedad va disminuyendo y ocurre intercambio de humedad por aumento de materia seca (Velásquez et al., 2008). Generalmente la semilla se cosecha cuando presenta un porcentaje del 13 a 20 % de humedad y se caracteriza por que alcanza la madurez fisiológica (Velásquez et al., 2008).

Tamaño: La germinación y vigor aumentan de acuerdo con el tamaño de la semilla, cuando la semilla alcanza su máximo tamaño a menudo coincide con la madurez fisiológica en la mayoría de las especies (Popinigis, 1985; Velásquez et al., 2008).

Madurez del fruto: En diferentes especies el momento de la cosecha de la semilla se determina por la maduración del fruto ya que coincide con la madurez fisiológica de la semilla (Ricci et al., 2013). Respecto a la maduración del fruto, pueden ser frutos inmaduros, maduros o sobremaduros con almacenamiento después de la cosecha para los dos primeros (Ricci et al., 2013; Moo-Muñoz et al., 2016; Martínez-Muñoz et al., 2019)

Color de fruto: En diversas hortalizas el color de fruto es considerado un indicador, por lo común se cosechan los frutos cuando pasan de color verde al color característico del fruto maduro; esta etapa presenta alta correlación con la madurez fisiológica de la semilla (Dos Santos et al., 2016).

Días después de antesis: Conocer la madurez fisiológica de semillas de diversos cultivos en base al color del fruto resulta difícil, por lo que se ha determinado conforme a los días después de antesis, mediante ensayos previos (Criollo & Upegui, 2005). Dependiendo del cultivo varían los días en que la semilla alcanza la madurez fisiológica (Criollo & Upegui, 2005; Ayala et al., 2014; Dos Santos et al., 2016).

### **2.5.3 Germinación**

La germinación de semillas es un mecanismo en el que alteraciones morfológicas y fisiológicas resultan en la activación del embrión (Miransari & Smith, 2014). Se inicia con la entrada de agua en la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula (Miransari & Smith, 2014).

**Imbibición:** La primera etapa de la germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla desde el medio exterior (imbibición). La hidratación de los tejidos de la semilla es un proceso físico con una duración variable según la especie (De la Cuadra, 1993).

**Activación del metabolismo y proceso de respiración:** Una vez que la semilla se ha hidratado adecuadamente, entra en una segunda etapa que se caracteriza por la disminución en la absorción de agua. Durante esta etapa tiene lugar una activación generalizada del metabolismo de la semilla que incluye la formación de ATP y la actividad respiratoria (De la Cuadra, 1993).

**Digestión y transporte de alimentos:** Lo primero que necesita el embrión para comenzar a desarrollarse es alimento, por ello libera enzimas digestivas que disuelven parte del alimento que es absorbido desde el tejido almacenador hasta el embrión (De la Cuadra, 1993). Gracias a esta alimentación el embrión puede respirar más rápidamente y crecer (De la Cuadra, 1993).

**Crecimiento del embrión:** Paralelamente al incremento de la actividad metabólica se produce el crecimiento, las células embrionarias son pequeñas antes de la germinación y el primer crecimiento del embrión se debe a que sus células aumentan su tamaño y no a que se multipliquen (Villamil & García, 1998). El embrión utiliza las proteínas, las grasas y los hidratos de carbono, digeridos y absorbidos desde el tejido de almacén de alimentos, para respirar y para alargar sus células (Villamil & García, 1998). Las semillas que han alcanzado la fase de crecimiento no pueden volver a etapas anteriores y en el caso de que las condiciones del medio no permitan que esta fase pueda seguir adelante, la semilla morirá (De la Cuadra,

1993). La germinación se considera que ha terminado cuando la radícula emerge a través de las cubiertas seminales (De la Cuadra, 1993).

#### **2.5.4 Calidad de la semilla**

Las semillas son esenciales en la producción agrícola ya que tienen el potencial para generar altos rendimientos y frutos de buena calidad en cualquier cultivo (Ortega, 2014).

Una semilla es considerada de buena calidad si al sembrarla presenta buenas condiciones para germinar y producir una planta normal y vigorosa (Cid et al., 2014). La tecnología de semillas ha definido cuatro parámetros de calidad:

**Calidad física:** Un lote debe tener bajo porcentaje de semillas enfermas, dañadas, de material inerte o maleza. El tamaño de la semilla debe ser uniforme: generalmente las semillas maduras medianas y grandes presentan mayor germinación y vigor (Ortiz et al., 2005; FAO, 2012). Las semillas deben contener poca humedad para que no dificulte su viabilidad (Ortiz et al., 2005; FAO, 2012).

**Calidad fisiológica:** Es la capacidad de la semilla para generar una nueva planta. El vigor y porcentaje de germinación son indicadores de la facultad de la semilla para emerger del suelo y generar una planta en el campo en condiciones normales (Ortiz et al., 2005; FAO, 2012).

**Calidad genética:** Las plantas producidas por semillas de una variedad vegetal tienen que presentar uniformidad y permanecer inalterables, además deben ser reproducibles de una generación a otra (Ortiz et al., 2005; FAO, 2012).

**Calidad sanitaria:** Es la presencia o ausencia de plagas y patógenos dentro y fuera de la semilla (FAO, 2012). El empleo de semillas libres de enfermedades es un factor determinante en el rendimiento y calidad (Cid et al., 2014).

#### **2.5.5 Certificación de semillas**

En México, la liberación de semillas mejoradas, su calificación, producción y comercialización están reguladas por la Ley Federal de Producción, Certificación y

Comercio de Semillas (LFPCCS). La entidad certificadora es el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (Ortega, 2014). El proceso de calificación de semillas certificadas consiste en verificar e inspeccionar las semillas para siembra, desde su origen, durante su proceso de producción en campo, acondicionamiento, almacenamiento y hasta su comercialización (Domínguez-García et al., 2019). Sólo semillas que cumplen con alta calidad genética, fisiológica, física y sanitaria son certificadas (Domínguez-García et al., 2019).

#### **2.5.6 Análisis de las semillas**

La Asociación Internacional de Ensayo de Semillas (ISTA) es la encargada de adoptar, establecer y publicar normas para la toma de muestra y ensayo de semillas, así como promover su aplicación uniforme para la evaluación de aquellas que circulan en el comercio internacional (Montero & Peláez, 2008).

#### **2.5.7 Análisis de las principales características de calidad de semilla**

El objetivo de las pruebas de laboratorio es evaluar la calidad física, fisiológica y problemas de plagas y enfermedades que afectan la germinación y emergencia de la semilla (Vallejo et al., 2008).

**Pureza genética:** Se hace mediante un catálogo de descripción varietal en donde se describen las características morfológicas, fisiológicas agronómicas y bioquímicas con las que fue liberada la variedad de interés (FAO, 2016).

**Germinación:** Mide la facultad de la semilla para generar una plántula normal en condiciones ambientales favorables (FAO, 2016). Conforme a las especies se establece: tamaño de la muestra, sustrato, temperatura, condiciones de humedad, luz, días adecuados para la evaluación de las plántulas y tratamientos que se pueden emplear para favorecer la germinación o romper algún grado de latencia de las semillas (ISTA, 1976; FAO, 2016).

**Pureza física:** Este análisis se hace para determinar la composición en peso de la muestra que se analiza e identificar las distintas especies de semillas contaminantes, semillas dañadas y de las partículas de materia inerte que

constituyen una muestra (Ortega, 2008). Es expresada como el porcentaje del peso que pertenece a la semilla de interés respecto al peso total de la muestra de un lote determinado (Ortega, 2008; FAO, 2012).

Vigor: Es el poder germinativo de la semilla en condiciones adversas (Thomson, 1979); y la capacidad o potencia de crecimiento y desarrollo óptimo de una plántula hasta que llega a ser planta adulta.

Las pruebas para medir el vigor son: índice de velocidad de emergencia, evaluación del crecimiento de plántulas y emergencia total de plantas (emergencia en arena), prueba de envejecimiento acelerado y prueba de frío (ISTA, 1976; Vallejo et al., 2008).

Sanidad: Para identificar la existencia de patógenos en la semilla se utilizan: examen de embriones, exámenes directos, pruebas de papel filtro, pruebas serológicas, agar, crecimiento, entre otras (FAO, 2016).

Viabilidad: Para la evaluación y medición de la viabilidad se usan diferentes tipos de pruebas, entre las que destacan: ensayos de germinación, test del tetrazolio, y radiografía con rayos X (Pérez & Pita, 2001).

Contenido de humedad: Existe una relación directa entre contenido de humedad, tasa de deterioro y susceptibilidad al daño mecánico, aptitud para el almacenamiento, nivel de infección por insectos y ataque de hongos (FAO, 2012). La cuantificación es posible realizarla directa o indirectamente. El método directo se hace con hornos de confección y se basa principalmente en la variación de peso de la muestra (FAO, 2016). El indirecto se realiza con aparatos de medición del contenido de humedad, estableciendo a través de la conductividad eléctrica y/o constante dieléctrica el porcentaje de humedad de las semillas (FAO, 2016).

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Aguilar, R. V. H., Corona T. T., López, L. P., Latournerie, M. L., Ramírez, M. M., Villalón, M. H. & Aguilar, C. J. A. (2010). *Los Chiles de México y su Distribución*. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN.
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L., & 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:10.3732/ajb.0800155>
- Aguirre-Mancilla, CL., Iturriaga-De la Fuente G., Ramírez-Pimentel J.G., Covarrubias-Prieto J., Chablé-Moreno F., & Raya-Pérez J.C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 19-31.
- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.
- Arriagada, V. (2000). *Semillas, Inspección, análisis, tratamiento y legislación*. IICA.
- Ayala, V. M. J., Ayala, G. O. J., Aguilar, R. V. H., & Corona, T. T. (2014). Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annuum* L. durante su desarrollo en el fruto. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(1), 79-87.
- Azcón, B. J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2da ed.). McGrawHill.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Baloch, F.S., Alsaleh, A., Shahid, M.Q, ...& Hatipoglu, R. (2017) A whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from Central Fertile Crescent. *PloS One*, 12(1), e0167821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167821>
- Baltazar, B. (1997). *Diversidad genética del cultivo de chile (Capsicum spp.) determinada por isoenzimas y RFLP's tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestre en su área de distribución*. CONABIO.
- Bidwell, R. GS (1993). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor SA.
- Bobadilla-Larios, V., Esparza-Ibarra, E., Delgadillo-Ruiz, L., Gallegos-Flores, P., & Ayala-Lujan, J. L. (2017). Variedades de chile (*Capsicum annuum* L.)

- identificadas mediante marcadores RAPD. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3), 465-473.
- Bojacá, C. R., Monsalve, O., Casilimas, H., Gil, R., Villagrán, E., Arias, L. A., & Fuentes, L. S. (2012). *Manual de producción de pimentón bajo invernadero*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Centro de Bio-Sistemas.
- Carvalho, N. D., & Nakagawa, J. (2000). *Sementes: ciência, tecnologia e produção* (4. Ed.). Jaboticabal: Funep.
- Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Mendoza-Elos, M., Vargas-López, A., & Cárdenas-Morales, H. (2008). Colección y caracterización de Chile (*Capsicum* spp) en Tabasco, México. *Phyton*, 77, 189-202.
- Castellón-Martínez, E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chavez-Servia, J. L., & Vera-Guzmán, A. M. (2014). Variación fenotípica de morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) nativo de Oaxaca, México. *Phyton*, 83(2), 225-236.
- Cid, R. J. A., Reveles, H. M., & Velásquez V. R. (2014). *Selección y almacenamiento de semilla de frijol* (Folleto Técnico No. 64). CIRNOC-INIFAP.
- Criollo E., H., & Upegui, E. P. A. (2005). Determinación de la madurez fisiológica de semillas de *Physalis peruviana* L. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 22(1), 1-13.
- De la Cuadra, C. (1993). *Germinación, latencia y dormición de las semillas* (Hojas divulgadoras No. 3). Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario.
- Dias, D. C. F. S., Ribeiro, F. P., Dias, L. A. S., Silva, D. J. H., & Vidigal, D. S. (2006). Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. *Seed Science and Technology*, 34(3), 691-699.
- Dida, G (2022). Molecular markers in breeding crops: recent progress and advancements. *International Journal of Novel Research in Life Sciences*, 9 (5), 10-21. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7057206>
- Domínguez-García, I. A., Reyes-Altamirano-Cárdenas, J., Barrientos-Priego, A. F., & Ayala-Garay, A. V. (2019). Análisis del sistema de producción y certificación de semillas en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(4), 347-356.
- Dos Santos, H. O., Dutra, S. M. F., Pereira, R. W., Pires, R. M. D. O., Da Rosa, S. D. V. F., & De Carvalho, M. L. M. (2016). Physiological quality of habanero pepper (*Capsicum chinense*) seeds based on development and drying process.

*African Journal of Agricultural Research*, 11(12), 1102-1109.  
<https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10462>

Espíndola, L. J. M., & Smirdele, O. J (2014). Physiologic quality of pepper seeds obtained from to fruit maturation and storage and storage. *Ciências Agrárias, Londrina*, 35 (1), 251-258. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n1p251>

FAO, (2012). *Semillas en emergencias* (Manual técnico). FAO.

FAO. (2016). *Manual de procedimientos para la certificación oficial de semillas*. FAO

García-Tierrablanca, E. A., Raya-Pérez, J. C., Covarrubias-Prieto, J., Dorantes-González, J. A. R., Chablé-Moreno, F., Ramírez-Pimentel, J. G., & Aguirre-Mancilla, C. (2015). Evaluación de técnicas de emasculación y maduración de fruto para la producción de semilla en Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (11), 2129-2137.

Gaviola, J. C. (2020). *Producción de semillas hortícolas*. Ediciones INTA.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international*, 14 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>

Hernández-Verdugo, S., Porras, F., Pacheco-Olvera, A., López-España, R. G., Villarreal-Romero, M., Parra-Terraza, S., & Osuna Enciso, T. (2012). Caracterización y variación ecogeográfica de poblaciones de Chile (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) silvestre del noroeste de México. *Polibotánica*, (33), 175-191.

Hernández-Villareal, A. E. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias*, 2(3), 113-118.

Hidalgo, R. (2003). Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In Franco, T. L. e Hidalgo, R. (Eds.) *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos* -Boletín Técnico 8 (pp. 2-26). IPGRI.

IPGRI (1995). *Descriptors for Capsicum spp.* Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI).

ISTA (1976). International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, 4, 3-177.

- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., & Moruppa, S. M. (2011). The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, 11(5), 5-12.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2013). *Conceptos de Genética*. (10ª ed.). Pearson Educación.
- Latournerie, L., Chávez, J. L., Pérez, M., Hernández, C. F., Martínez, R., Arias, L. M., & Castañón, G. (2001). Exploración de la diversidad morfológica de chiles regionales en Yaxcabá, Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana*, 12(1), 41-47.
- Lee, J. (2019). Development and evolution of molecular markers and genetic maps in *Capsicum* species. In Ramchiary, N., & Kole, C. (Eds.). (2019), *The Capsicum Genome* (pp. 85-103). Springer International Publishing.
- Lesur, L. (2006). *Una guía paso a paso: Manual del cultivo del chile*. Trillas.
- Liu, W., Shahid, M.Q., Bai, L, Lu, Z., Chen, Y., Jiang, L., Diao, M.,...& Lu, Y. (2015). Evaluation of genetic diversity and development of a core collection of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) populations in China. *PLoS One*, 10 (12), e0145990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145990>
- López, L. P. (2007, abril 7). El chile 'de agua': un chile típico de los Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Agroproduce*, 16, 8-12.
- Marín-Montes, I. M., Rodríguez-Pérez, J. E., Sahagún-Castellanos, J., Hernández-Ibáñez, L., & Velasco-García, Á. M. (2016). Variación morfológica y molecular de 55 colectas de tomate nativo de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 22(2), 117-132
- Martínez-Muñoz, M., Ayala-Garay, Ó. J., Aguilar-Rincón, V. H., Conde-Martínez, V., & Corona-Torres, T. (2019). Seed quality and LEA-protein expression in relation to fruit maturation and post-harvest storage of two chili types. *The Horticulture Journal*, 88(2), 245-252. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-044>
- Martínez-Sánchez, D., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Pérez, J. E., Pérez, M., & del Carmen, E. (2010). Colecta y caracterización morfológica de 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 16(3), 169-176.

- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>
- Montero, G. T. D. J., & Peláez R. V. (2008). Inserción del servicio de inspección y certificación de semillas (SICS) en el sistema estatal de sanidad vegetal. Impacto estructural a partir del 2000. *Fitosanidad*, 12(1), 63- 68.
- Monteros, A., Tacán, M., Peña Monserrate, G. R., Tapia, C., Paredes, N., & Lima, L. (2018). *Guía para el manejo y conservación de recursos fitogenéticos en Ecuador: Protocolos*. INIAP.
- Moo-Muñoz, A. J., Latournerie-Moreno, L., Pinzón-López, L. L., Ayala-Garay, O. J., & Tzec-May, Y. A. (2016). Efecto de la madurez y secado de semilla de *Capsicum chinense* Jacq. en la germinación y calidad fisiológica de plántula. *Agroproductividad*, 9(1), 63-67.
- Namesny, A. (2006). *Pimientos. Compendios de Horticultura* (2<sup>da</sup> ed.). Horticultura SL Reus.
- Nuez, F., Ortega, G., & Costa, R. (2003). *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes* (3ra Ed.). Mundi Prensa.
- Orellana, B., Escobar, J. C., Morales, A. J., Méndez, I. S., Cruz, R. A., & Castellón, M. E. (2012). *El cultivo de chile dulce. Guía técnica*. Centro Nacional de tecnología agropecuaria y forestal.
- Ortiz, T. C., Espinosa, C. A., Azpiroz, R. H. S., & Sahagún, C. S. (2005). *Producción y tecnología de semillas de maíz del INIFAP para los Valles Altos y zona de transición* (Libro Técnico Núm. 3). INIFAP-CIRCE.
- Pérez, F. G., & Pita, J. M. V. (2001). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas* (Hojas divulgativas). Universidad Politécnica de Madrid.
- Pérez-Castañeda, L. M., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., & Mayek-Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum spp.* *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 117-128.
- Peterson, G.W., Dong, Y., Horbach, C., & Fu, Y.B. (2014). Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity*, 6, 665–680. <http://dx.doi.org/10.3390/d6040665>

- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casas, A., Castañeda, A., ... & Zúñiga, G. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In Sarukhan, J. (Edit.), *Capital Natural de México* (pp. 437-494). CONABIO.
- Popinigis, F. (1985). *Fisiología da semente* (2ª ed.). Brasilia.
- Ramalho, d. E., & Monteiro, d. M. (2016). Genetics and breeding of chili pepper *Capsicum* spp. In Ramalho, D. E., Monteiro d. M. and Luiz F. F. (Eds.), *Production and breeding of chilli peppers (Capsicum spp.)* (57-80). Cham Switzerland: Springer
- Riaz, A., Anjum, M. A., & Balal, R. M. (2020). From markers to genome-based breeding in horticultural crops: an overview. *Phyton*, 89(2), 183. <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.08537>
- Ricci, N., Pacheco, A. C., Conde, A. S., & Custódio, C. C. (2013). Qualidade de sementes de pimenta jalapenho em função da maturação e tempo de permanência nos frutos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(2), 123-129.
- Ríos, E., Mejía, H. & Álvarez, S. (2009). Marcadores moleculares: una Revolución en la Zoología. *Ciencia*, 5–13.
- Ruiz, C. J.A., Medina, G. G., González, A. I. J., Flores, L. H. E., Ramírez O. G., Ortiz T. C., & Martínez P. R. A. (2013). *Requerimientos agroecológicos de cultivos* Libro Técnico Núm. 3 (2ª Ed.). INIFAP-CIRPAC.
- Ruiz, M. B., & Parera, C. A. (2017). Effect of harvesting time on seed quality of two bell pepper cultivars (*Capsicum annuum*). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(2), 67-77.
- Taitano, N., Bernau, V., Jardón-Barbolla, L., Leckie, B., Mazourek, M., Mercer, K., ... & van der Knaap, E. (2019). Genome-wide genotyping of a novel Mexican chile pepper collection illuminates the history of landrace differentiation after *Capsicum annuum* L. domestication. *Evolutionary Applications*, 12(1), 78-92. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12651>
- Thomson, J. R. (1979). *Introducción a la tecnología de las semillas*. Acribia.
- Toledo-Aguilar, R., López-Sánchez, H., López, P. A., Guerrero-Rodríguez, J. D. D., Santacruz-Varela, A., & Huerta-de la Peña, A. (2016). Diversidad morfológica

de poblaciones nativas de Chile poblano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1005-1015.

- Vallejo, D. H. L., Ramírez, D. J. L., Chuela B. M., & Ramírez Z. R. (2008). *Manual de Producción de Semilla de Maíz. Estudio de Caso* (Folleto Técnico Núm. 14). INIFAP, CIRPAC.
- Velásquez, J., Monteros, A., & Tapia, B. (2008). *Semillas, tecnología de producción y conservación*. INIAP.
- Villamil, J. M. P., & García, F. P. (1998). *Germinación de semillas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Votava, E. J., Baral, J. B., & Bosland, P. W. (2005). Genetic diversity of Chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany*, 59(1), 8-17.
- Walsh, B. M., & Hoot, S. B. (2001). Phylogenetic relationships of *Capsicum* (*Solanaceae*) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. *International Journal of Plant Sciences*, 162(6), 1409-1418.
- Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annuals Reviews Plant Biology*, 56, 253-279. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>
- Zapata, N. M., Bañón A. S., & Cabrera, F. P. (1992). *El pimiento para pimentón*. Mundiprensa.

## CAPÍTULO 3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE CHILE ‘DE AGUA’ EN MÉXICO (*Capsicum annuum* L.)

### 3.1 RESUMEN

En el presente trabajo se abordan diferentes estudios realizados para conocer más sobre la diversidad de chiles (*Capsicum spp.*) en México con enfoque en el chile criollo ‘de agua’. La diversidad de relieves, climas y el cultivo tradicional han propiciado que haya una amplia variabilidad de morfotipos diferentes entre cultivados y silvestres distribuidos en todo el territorio; por tal motivo, el país es considerado como centro de domesticación de este cultivo. Algunos chiles son conocidos nacionalmente, mientras que otros sólo se identifican a nivel regional como lo es el chile ‘de agua’, considerado endémico de los Valles Centrales de Oaxaca donde es valorado por su importancia económica, social y consumo. Para comprender la diversidad de los chiles se han realizado caracterizaciones morfológicas *in situ* y *ex situ* mediante colectas y con marcadores moleculares. Respecto al chile ‘de agua’ han llevado a cabo estudios de carácter agronómico, con marcadores morfológicos y moleculares para conocer su diversidad. No obstante, no se han realizado estudios que contemplen accesiones que provengan de la mayoría de los distritos que componen los Valles Centrales por lo que es necesario realizar más investigación en este cultivo.

**Palabras clave:** diversidad, marcadores moleculares y morfológicos.

## GENETIC DIVERSITY OF 'DE AGUA' CHILI IN MEXICO (*Capsicum annum* L.)

### 3.2 ABSTRACT

This work is a review of different studies carried out to learn about the chilis (*Capsicum spp.*) diversity in Mexico are addressed, with a focus on the landrace chili 'de agua'. The diversity of reliefs, climates and traditional crop has led to a wide variability of different morphotypes between cultivated and wild distributed throughout the territory; For this reason, the country is considered a center of domestication of this crop. Some chilis are known nationally, while others are only identified at the regional level, such as the 'water' chile, considered endemic to the Central Valleys of Oaxaca where it is valued for its economic, social and consumption importance. To understand the diversity of chili peppers, in situ and ex situ morphological characterizations have been carried out through collections and with molecular markers. Regarding the 'water' chili, they have carried out studies of an agronomic nature, with morphological and molecular markers to know its diversity. However, no studies have been carried out that contemplate accessions that come from most of the districts that make up the Central Valleys, so it is necessary to carry out more research on this crop.

**Key words:** diversity, molecular and morphological markers

### 3.3 INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum* spp.) pertenece a la familia de las solanáceas, del género *Capsicum* donde se reconocen cinco especies domesticadas: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. annuum* y alrededor de 25 silvestres y semicultivadas (Aguilar-Rincón et al., 2010). Todas las especies del género *Capsicum* son de América (Nuez et al., 2003), siendo su origen botánico para la mayoría en América del Sur, en las zonas tropicales y subtropicales de países como Bolivia y Perú, de donde se propagó al resto de América Central y Sudamérica (Namesny, 2006; Bojacá et al., 2012). El complejo *Capsicum annuum* tiene su centro de origen en Mesoamérica, específicamente en México con una localización secundaria en Guatemala (Namesny, 2006). El chile en México fue domesticado en la época prehispánica por los pueblos anteriores a la conquista que lo cultivaron con gran intensidad (Bosland et al., 2012).

Por el valor económico y superficie sembrada *C. annuum* es la especie de chile más importante a nivel mundial, siendo México el que tiene mayor diversidad, de formas, colores y tamaño de fruto (Lesur, 2006; Aguirre-Mancilla et al., 2017). México ocupa el segundo lugar en la producción de chile en el mundo con 3,197,263 toneladas, producción que bajó en 2020 con respecto al año anterior; no obstante, su valor de producción aumentó un 1 %, obteniéndose ingresos por \$ 33,093,944,000 pesos (\$1,843,058,993.8) USD (SIAP, 2021). El chile en México es uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista cultural, agronómico, nutricional y económico. Los chiles de mayor relevancia a nivel nacional son el jalapeño, ancho, serrano, mirasol y pimiento que representan del 70 a 80 % de la producción nacional (Aguirre-Mancilla et al., 2017). Otros tipos comunes son el chile pasilla, de árbol, piquín, habanero, manzano, morita, mulato, y poblano, entre otros (Aguirre-Mancilla et al., 2017).

De igual manera hay otro tipo de chiles que sólo se cultivan y consumen en una determinada región, como los chiles 'Huacle', dulce, y 'de agua', siendo este último endémico de los Valles Centrales de Oaxaca donde es considerado de suma importancia económica, social y de consumo (Velasco et al., 1998).

Los sistemas agrícolas tradicionales han promovido la diversidad morfológica de este tipo de chile (Martínez-Sánchez et al., 2010). Para comenzar un programa de mejoramiento genético o con fines de conservación es necesario conocer dicha diversidad.

### **3.3.1 Origen del chile ‘de agua’**

El chile ‘de agua’ (*Capsicum annuum*) se considera que es originario y endémico de los Valles Centrales de Oaxaca, ya que la mayoría de los productores de la región mencionan que éste tiene una antigüedad de más de 100 años en esta área y no se siembra en otras regiones (López, 2007).

#### **3.3.1.1 Descripción morfológica del chile ‘agua’**

El chile ‘de agua’ es una planta herbácea anual, con ramificación dicotómica, altura promedio de 60 cm, de raíz típica con un gran número de raíces secundarias con longitud promedio de 27 cm y tallo erecto. Las hojas son alternas y ovaladas, con ápice acuminado, base atenuada, borde liso, pinnadamente nervadas, glabras en haz y envés (López, 2007). Las flores son axilares, solitarias, completas y perfectas, mientras que el fruto es una baya de forma cónica alargada con un tamaño medio de 15 cm de largo, 6 cm de diámetro en su base, de color verde amarillo, verde oscuro, rojo intenso y brillante en su madurez (López, 2007). Las semillas son de forma reniforme, lisas y sin brillo, de color blanco en fruto fresco y amarillentas en fruto seco. Su diámetro promedio es de 4 mm (López, 2007).

#### **3.3.1.2 Requerimientos agroclimáticos**

Tiene una amplitud de adaptación debido a que se cultiva en varios distritos de la región, principalmente en los suelos del fondo del Valle, clasificados dentro de la serie Feozem, bajo un clima semicálido subhúmedo y semicálido seco (López, 2007).

### 3.3.1.3 Plagas y enfermedades

#### Plagas

El cultivo puede ser atacado por el barrenador del chile (*Anthonomus eugeni* Cano) cuya larva es color crema, mide 1.6 mm de largo; el adulto es negro de 3 a 4 mm de longitud, posee un pico que utiliza para alimentarse y abrir agujeros donde la hembra coloca sus huevos (Garza, 2001). El daño por este insecto puede presentarse desde el comienzo de la primera floración hasta la fructificación. En el fruto dañado presenta un orificio, del cual sale el adulto, pudiendo servir éste de entrada a patógenos secundarios (Garza, 2001).

Los adultos de la Mosca blanca (*Bemisia tabaci*) son de color blanco, miden alrededor de 1.5 a 3.0 mm, tanto las ninfas como los adultos causan daño al alimentarse, porque al succionar la savia de la planta, la debilitan, sin embargo, el daño más importante es como vector de enfermedades de naturaleza viral (Bojacá et al., 2012).

Las ninfas y los adultos del Pulgón (*Myzus persicae*) son de color amarillo y verde claro; los adultos miden alrededor de 1.5 mm viven en colonias, en el envés de las hojas terminales y en los brotes (Bojacá et al., 2012). Al alimentarse succionan savia e inyectan toxinas que provocan el enrollamiento de las hojas, pero el daño más importante es debido a la transmisión de virus (Bojacá et al., 2012).

Las plantas atacadas por psílido del tomate (*Paratrioza cockerelli*) detienen su crecimiento y presentan síntomas de sequía, las hojas maduras se enrollan hacia arriba (Barrantes, 2010). De igual manera es vector de virus (Barrantes, 2010). El ciclo de huevecillo a adulto bajo las condiciones de la región es de 15.4 días; el adulto mide 2.75 x 0.8 mm incluyendo las alas (Barrantes, 2010).

#### Enfermedades

La antracnosis del fruto (*Colletotrichum* sp.) se presenta durante la temporada de lluvias en frutos maduros y el daño puede ocurrir en cualquier parte de este (Chew

et al., 2008). El síntoma inicial consiste en una pequeña lesión de color blanquizco, que conforme avanza en su desarrollo se torna hundida, amarillenta, de forma circular (Chew et al., 2008).

El daño debido al manchado del fruto (*Alternaria* sp.) inicia sobre la placenta, semillas y cara interna del fruto, siendo difícil determinar la presencia de este patógeno en frutos en madurez fisiológica o comercial (Chew et al., 2008). Se caracteriza por presentar lesiones o manchas de un color oscuro, se hunden ligeramente y se observa un moho gris oscuro o negro que puede cubrir parcial o totalmente la lesión (Chew et al., 2008).

La podredumbre blanda del fruto (*Erwinia carotovora*) se presenta durante el ciclo de producción primavera- verano (Chew et al., 2008). Los daños de la bacteriosis se observan sobre cualquier parte del fruto en forma de depresiones acuosas y blandas (Chew et al., 2008).

Existen enfermedades virales como Virus Jaspeado del Tabaco (VJT), Virus Mosaico del Tabaco (VMT) y Virus Mosaico del Pepino (VMP). Los daños en la planta son síntomas de: mosaicos o jaspeados de color amarillento que evolucionan a una clorosis difusa y distorsión del limbo foliar, deformación de la lámina foliar, enrollamiento de la hoja, acortamiento de entrenudos y aborto de flores (Robles-Hernández et al., 2010). Los daños por VMT generan frutos con manchas o moteados amarillos, disminución del tamaño y deformaciones; con el VMP presentan deformaciones, disminución del tamaño, alteraciones en forma de manchas de color verde oscuro y maduración irregular; mientras que el VJT produce deformaciones del fruto (Robles-Hernández et al., 2010).

#### **3.3.1.4 Historia del chile ‘de agua’**

La historia de la especie se puede dividir en cuatro épocas. La primera de principios del siglo 20 hasta 1970, en la cual el chile ‘de agua’ se cultivaba sólo en algunos municipios de los distritos de Tlacolula, Zaachila y Zimatlán y su proceso productivo era tradicional (López, 2007).

La segunda fue de 1970 a 1985 y se considera su auge porque se incorporó al proceso de producción el uso de insumos agrícolas, el tractor y la bomba de gasolina para riego generando un incremento en el rendimiento y la superficie de cultivo hasta 250 hectáreas en la región (López, 2007). La tercera de 1985 a 1994 se caracterizó por la aparición de una enfermedad viral, conocida regionalmente como: "amarillamiento" o "chino" del chile 'de agua', lo que generó una reducción de la superficie sembrada y rendimiento, además aumentó los costos de producción (López, 2007). Época actual de 1995 en adelante, se han adoptado tecnologías modernas, como el uso de invernaderos, acolchados, riego por goteo, sin embargo, por la alta inversión inicial estas tecnologías sólo son utilizadas por un reducido número de productores (López, 2007).

#### **3.3.1.5 Importancia económica del chile 'de agua'**

En el estado de Oaxaca durante el año 2019 se cultivaron 2,577 ha de chile, con una producción total de 10,268 toneladas. En la región de los Valles Centrales de Oaxaca en el mismo año, se establecieron 253.34 hectáreas de chile 'de agua' que produjeron un total de 1,778 toneladas (SIAP, 2021). El chile 'de agua' se produce en 33 de los 121 municipios que integran esta región.

#### **3.3.2 Importancia de la conservación de la diversidad de los chiles**

Dentro de la diversidad en México de la especie *C. annuum* se encuentran diversos chiles domesticados, semi-domesticados y silvestres, que es necesario estudiar y preservar ya que se han visto diezmados por factores como, plagas y enfermedades, la sustitución del cultivo, la migración y abandono del cultivo, la introducción de variedades mejoradas y el cambio de uso de suelo (Aguilar et al., 2006). La pérdida de la diversidad hace vulnerable a la especie al cambio climático, por ello es necesario poseer una amplia riqueza genética que permita la adaptación de las especies a nuevas condiciones, de aquí la gran importancia que tiene la conservación de los recursos fitogenéticos, ya que estos recursos se pueden usar para el mejoramiento genético utilizando caracteres deseables o tolerancia a factores bióticos y abióticos (Martínez-Sánchez et al., 2010).

Es por lo que los estudios morfológicos, genéticos y ecológicos de materiales domesticados, semidomesticados y silvestres resultan de gran importancia para el uso y conservación de este importante recurso genético (Latournerie et al., 2001).

En México se ha realizado la exploración, colecta, identificación, caracterización y conservación in situ y ex situ de los recursos fitogenéticos silvestres y domesticados de las principales especies cultivadas de Chile (Pérez-Castañeda et al., 2015); a pesar de ello, aún falta por explorar la diversidad existente en diferentes partes del país ya que los estudios realizados sólo provienen de regiones específicas y faltan más morfotipos de Chile regionales por caracterizar para conocer su diversidad.

### **3.3.2.1 Estudio de la diversidad genética de Chile en México**

La diversidad genética se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población, entre las poblaciones de una especie y entre especies (Piñero et al., 2008; Rimieri, 2017). La riqueza genética de Chile a lo largo del territorio mexicano se debe en gran parte a la diversidad de factores geográficos, edáficos y climáticos, y a la persistencia de los sistemas tradicionales de cultivo en donde han prosperado las especies de Chile (Latournerie et al., 2001). Adicionalmente, el comportamiento reproductivo es determinante en el grado de diversidad genética entre los cultivos, a pesar de que las especies de *Capsicum* son consideradas autógamas su comportamiento reproductivo es muy inconstante, ya que el porcentaje de autopolinización va del 70 al 95 %, por lo tanto, existe un alto grado de polinización cruzada que ha generado germoplasma genéticamente diverso (Toledo-Aguilar et al., 2016). Se sabe que en las especies de *Capsicum* los morfotipos son los principales niveles de diversidad, pero también existe la diversidad intra-morfotipos que puede aprovecharse con fines de conservación y usos (Latournerie et al., 2001; Castellón-Martínez et al., 2014).

Con respecto al Chile (*Capsicum* spp.) se han hecho colectas a nivel nacional (Baltazar, 1997) y de igual manera investigadores han realizado de manera regional o localizada este tipo de muestreos, para determinar la diversidad existente, desde regiones del norte (Hernández-Verdugo et al., 2014; Ramírez-Meraz et al., 2015),

centro (Toledo-Aguilar et al., 2016) y sur-sureste de México (Latournerie et al., 2001; Castañón-Nájera et al., 2008; Castañón-Martínez et al., 2014). La diversidad genética de los diferentes tipos de chile se ha caracterizado morfológica y agronómicamente, en la actualidad con las herramientas biotecnológicas disponibles también se ha podido caracterizar la diversidad mediante el uso de marcadores moleculares (Taitano et al., 2019); no obstante, es conveniente incluir aspectos etnobotánicos, para tener un panorama más amplio de la diversidad existente.

### **3.3.3 Marcadores morfológicos**

La caracterización morfológica se ha realizado de manera *ex situ* en invernadero, en suelo o hidroponía (Toquica et al., 2003) y a campo abierto (Ramírez-Meraz et al., 2015; Toledo-Aguilar et al., 2016) utilizando fertirriego o fertilización normal. Asimismo, se ha hecho de manera *in situ* (Latournerie et al., 2001; Castañón-Nájera et al., 2008; Narez-Jiménez et al., 2014a) en regiones de Tabasco y Yucatán. Las caracterizaciones anteriores de diferentes especies de chile como *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens* ya sea para chiles silvestres, semi domesticados o domesticados (Latournerie et al., 2001; Castañón-Nájera et al., 2008; Narez-Jiménez et al., 2014a) o de algún fenotipo dentro de una especie en particular, se han realizado de acuerdo con el manual de descriptores morfológicos para *Capsicum* propuesto por IPGRI (1995) que consta de 71 caracteres morfológicos y agronómicos. Estudios más recientes se han basado en los descriptores propuestos por la UPOV (2005) de los cuales se tienen 53 caracteres (Ramírez-Meraz et al., 2015), mientras que en otros estudios se utilizaron descriptores propuestos por otros autores para planta, flor y fruto, en los que sólo utilizaron alrededor de 25 caracteres (Narez-Jiménez et al., 2014b).

Los descriptores más utilizados para planta son: altura y ancho de planta, diámetro y pubescencia de tallo, hábito de crecimiento, densidad de ramificación; en hoja: color y forma, margen de la lámina foliar, pubescencia, longitud y ancho de hoja; en flor: número de flores por nudo, posición de la flor, color y forma de corola; en fruto: color y forma del fruto, forma del fruto en la unión con el pedicelo, forma del ápice

del fruto, número de semillas por fruto, largo, ancho y peso de fruto (Castañón-Nájera et al., 2010). Debido al tiempo y el costo para tomar los caracteres morfológicos para medir la diversidad, algunos autores proponen que solo se cuantifiquen algunos descriptores de la planta, fruto y flor (Castañón-Nájera et al., 2010).

Los principales caracteres observados en donde hay variación es en ancho del fruto y forma de la hoja. En el caso de los tipos silvestres y domesticados hay diferencias en el color de la hoja y posición del fruto, los frutos de chiles domesticados presentan forma oblicua mientras que los silvestres se presentan de manera recta (Castañón-Nájera et al., 2008). La mayor variabilidad dentro del género *Capsicum* se observa primero a nivel de características de fruto, seguido de la arquitectura de la planta y finalmente de estructuras florales y número de flores por axila (Castañón-Nájera et al., 2010; Narez-Jiménez et al., 2014)

### **3.3.3.1 Análisis estadístico de marcadores morfológicos**

Antes de realizar una caracterización se debe tener definida la unidad básica de caracterización (UBC) que puede ser un individuo, un conjunto de individuos e incluso una especie (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2014). La UBC depende del objetivo de la caracterización, en este caso los estudios abordados se hicieron para conocer la variabilidad y diversidad del género *Capsicum* en México.

Una vez que se recaban los resultados de todas las variables evaluadas para cada UBC, se construye la matriz básica de datos (MBD). Consiste en un arreglo en forma de cuadrícula con tantas filas como UBC's se tengan (n) y una columna para cada variable (p). Generalmente en marcadores morfológicos la MBD se debe estandarizar (Hidalgo , 2003).

Las técnicas utilizadas en la caracterización de recursos fitogenéticos mayormente se engloban en la estadística multivariada. Uno de los objetivos principales de estas técnicas es hacer clasificaciones sobre las UBC con las similitudes o disimilitudes que presenten entre ellas de acuerdo a las variables evaluadas (Núñez-Colín &

Escobedo-López, 2011). Los principales análisis estadísticos que se utilizan son el análisis cluster y los análisis factoriales (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

El análisis clúster es un método matemático que está incluido en la estadística multivariada. Es utilizado principalmente para la formación de grupos de unidades básicas de caracterización UBC's con características similares a partir de las similitudes o disimilitudes que existen entre pares de UBC en  $n$  variables evaluadas (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011). Este análisis lo conforman dos métodos: el primero es el cálculo de los índices de similitud o disimilitud entre pares de UBC. El segundo es el método de aglomeración, a partir de los índices de similitud o disimilitud se generan los dendrogramas para que se pueda visualizar el parecido que presentan los grupos de UBC. Existen diferentes índices de similitud y disimilitud, así como métodos de aglomeración, la elección de estos debe ser conforme al objetivo de la caracterización y naturaleza de los datos (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011). Por último, se determina la altura de corte de los dendrogramas para definir el número adecuado de grupos, para ello se pueden hacer pruebas pseudoestadísticas como el criterio cúbico de agrupamiento, la pseudo estadística  $t^2$  y la pseudo F. Sin embargo, el cálculo de estas pruebas es difícil y no siempre se interpretan fácilmente. Por lo tanto, el investigador debe saber cómo cortar el dendrograma con base en su experiencia en estudios anteriores (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

Los análisis factoriales se usan para reducir información englobada en una serie de variables originales en una serie más pequeña de dimensiones compuestas o valores teóricos nuevos, con una pérdida mínima de información (Peña-Caballero et al., 2020). Los más utilizados son el análisis en componentes principales (ACP) se usa generalmente en datos cuantitativos, el de coordenadas principales (Acop) se usa para datos binomiales y el análisis factorial de correspondencias simple (AFC) está desarrollado para datos multinomiales (Peña-Caballero et al., 2020).

Para la caracterización morfológica en los estudios presentados sobre chiles en México se han utilizado tanto análisis factoriales (principalmente ACP) como análisis clúster. El primero permitió identificar las variables que más influyen en la

caracterización, mientras que el segundo permitió la conformación de grupos (Narez-Jiménez et al., 2014a; Toledo-Aguilar et al., 2016).

Respecto al ACP en el estudio realizado por Castañón-Nájera et al. (2008) encontraron que cuatro componentes principales explicaron 87.97 % de la varianza total, mientras que Toledo-Aguilar et al. (2016) con cuatro solo obtuvieron el 56 %. Por otro lado, Narez-Jiménez et al. (2014a) solo necesitaron de tres componentes para explicar el 73.27 % de la varianza total. En la mayoría de las investigaciones realizadas se ha encontrado que la variación explicada por el primer componente se relaciona en mayor proporción con variables de fruto (Narez-Jiménez et al., 2014a; Toledo-Aguilar et al., 2016), el segundo componente con variables de hoja y flor, y el último con hábitos de crecimiento y morfotipo de la planta. En general al hacer un análisis por componentes principales las variables de fruto han sido las de mayor valor descriptivo de la diversidad morfológica de chiles (Toledo-Aguilar et al., 2016).

Para determinar si entre las especies y dentro de ellas existe diversidad, o si algunos tipos de chiles son divergentes se han utilizado análisis clúster. Usando la distancia euclidiana como medida de disimilitud para obtener la matriz de distancias y junto con el método de ligamiento promedio (UPGMA) se han construido los dendrogramas (Narez-Jiménez et al., 2014a; Toledo-Aguilar et al., 2016). En un estudio realizado con accesiones pertenecientes a *C. annumm*, *C. chinense* y *C. frutescens* se encontró que el dendrograma se dividió por especies (Narez-Jiménez et al., 2014a), y dentro de ellas la mayor parte de los chiles cultivados y silvestres pertenecieron a *C. annumm* y fue donde se encontró la mayor diversidad.

### **3.3.3.2 Marcadores morfológicos en chile de agua**

Para la caracterización morfológica hay cuatro estudios realizados, sólo el de Martínez-Sánchez et al. (2010) es el único enfocado en chile 'de agua'. Estos autores caracterizaron ocho accesiones de los Valles Centrales de manera *in situ* y *ex situ* (invernadero) con los descriptores de chile *Capsicum spp* del IPGRI (1995). En la caracterización *in situ* encontraron 21 caracteres estables, los cuales pueden

ser considerados como marcadores morfológicos en el chile 'de agua'; en la caracterización *ex situ* encontraron 11 que contribuyeron ampliamente en la caracterización del chile 'de agua'. Los descriptores seleccionados muestran que existe una distribución de la variabilidad en la planta, con un carácter asociado a la raíz, tres al tallo, dos a la hoja, cuatro al fruto y cinco a la flor. Algunos resultados obtenidos de la caracterización son: la altura de planta de 108 a 118 cm en invernadero contrastando con la altura reportada en campo de 56.55 a 64.63, longitud del fruto de 9.14 a 10 cm y el diámetro de tallo osciló entre 0.85 y 1 cm (Martínez et al., 2010). Para determinar la diversidad morfológica entre las accesiones realizaron un análisis cluster para ello se usó las distancias euclidianas al cuadrado como medida de disimilitud y para el análisis de agrupamiento se utilizó el método Ward. Si bien, aunque el análisis clúster formó tres grupos sólo evaluaron ocho accesiones mediante 15 variables, por lo que aún no se ha evaluado de manera acertada la variabilidad en chile de agua (Martínez-Sánchez et al., 2010).

En el caso de Castellón-Martínez et al. (2014) llevaron a cabo una caracterización morfológica utilizando sólo algunos descriptores de chile (IPGRI, 1995) para la planta y fruto, además de medir parámetros de calidad en este último. En el estudio caracterizaron 52 accesiones de chile de los morfotipos chile 'de agua', 'Tabiche', 'Tusta', 'Piquín', 'Solterito' y 'Nanche'. Para chile 'de agua' se evaluaron ocho accesiones, observando que éste fue de crecimiento lento con una altura máxima de 62.2 cm, diámetro del tallo de 0.61 cm, la longitud del fruto fue de 5.40 cm y 11.4 frutos por planta. Constataron que en chile 'de agua' hubo diferencias entre poblaciones en altura de planta a 30 días del trasplante, longitud y ancho de fruto, rendimiento por planta y densidad del fruto, lo que sugiere la existencia de variabilidad que puede utilizarse en el mejoramiento genético (Castellón-Martínez et al., 2014).

Por último, Sanjuan- Martínez et al. (2018) y Sanjuan- Martínez (2020) evaluaron algunas variables morfométricas en chile 'de agua', chile 'Pasilla' y chile 'Huacle'. En chile 'de agua' observaron que la altura de planta fue de 66 a 67 cm, grosor de

tallo de 1.36 cm, 14 frutos por planta, sólidos solubles 5.3 °Brix y longitud de fruto de 10.5 cm.

Es importante resaltar que estas investigaciones se realizaron en invernadero con sistema hidropónico, pero la altura de planta observada por Martínez-Sánchez et al. (2010) fue superior a la de los demás estudios siendo casi el doble, por otro lado, los tres estudios restantes obtuvieron resultados parecidos, coincidiendo con lo reportado por López (2007) para Chile 'de agua' en campo abierto. Puesto que sólo se ha evaluado un número reducido de accesiones de Chile 'de agua', es necesario realizar estudios que incluyan más accesiones de diferentes sitios para que el análisis sea más robusto.

### **3.3.4 Marcadores moleculares**

De manera general, los marcadores moleculares se pueden clasificar en citogenéticos, bioquímicos y los basados en ADN, que a su vez se agrupan, según el método de identificación, en: a) los de clonación y de secuenciación; y b) los de impresión única o huella digital genética (Ríos et al., 2009).

Los marcadores basados en el ADN ofrecen numerosas ventajas sobre las alternativas fenotípicas (morfológicas) convencionales, ya que son estables y pueden detectarse en cualquier tipo de tejido. No son afectados por el medio ambiente y generalmente carecen de pleiotropía y efectos epistáticos (Equiarte et al., 2007). La variación genética detectada por estos marcadores puede usarse para manipular rasgos, realizar mapas genómicos (identificar lugares clave sobre el genoma), aislar loci genéticos y evaluar la diversidad genética de poblaciones (Equiarte et al., 2007; Ríos et al., 2009).

Los estudios de diversidad genética en *Capsicum* con marcadores moleculares se han llevado a cabo tanto a nivel nacional (Votava et al., 2005) como en regiones específicas de México (Contreras-Toledo et al., 2011; Troconis-Torres et al., 2012; Bobadilla-Larios et al., 2017), en chiles cultivados (Bobadilla-Larios et al., 2017), semi domesticados y silvestres. Generalmente se hacen colectas y las semillas se

germinan en viveros bajo condiciones controladas en invernadero. Como ya se mencionó la caracterización molecular basada en el ADN mide la variación de las diferentes accesiones colectadas de Chile y no se ve influenciada por factores ambientales, así que no importa si se realiza de manera *in situ* o *ex situ* (Equiarte et al., 2007).

Una vez que germinan las semillas y se tienen los primeros pares de hojas verdaderas se procede a la extracción del ADN en hojas jóvenes (Toquica et al., 2003; Votava et al., 2005; Contreras-Toledo et al., 2011; Bobadilla-Larios et al., 2017). Sin embargo, la germinación en chiles silvestres o semi domesticados en muchos casos no es uniforme o simplemente no ocurre, por lo que se puede recurrir a la extracción de ADN directamente de las semillas (Hernández-Peña, 2019). En otros estudios se ha optado por extraer el ADN de la cáscara y pulpa de los frutos colectados (Troconis-Torres et al., 2012).

En la mayoría de los estudios la extracción del ADN a partir de las hojas se ha realizado utilizando el método CTAB y posteriormente se lleva a cabo la amplificación por PCR (Votava et al., 2005; Troconis-Torres et al., 2012). En los trabajos efectuados con RAPD's ha variado la cantidad de iniciadores, pues se han usado tres (Bobadilla-Larios et al., 2017), cinco (Troconis-Torres et al., 2012) y hasta diez (Votava et al., 2005).

Los marcadores más utilizados han sido los RAPD's (Votava et al., 2005; Troconis-Torres et al., 2012; Bobadilla-Larios et al., 2017), los AFLP'S (Toquica et al., 2003), microsatélites (Contreras-Toledo et al., 2011) y los tipos ISSR's (Hernández-Peña, 2019). Estos marcadores no requieren conocer anteriormente la secuencia del genoma del Chile, además son altamente polimórficos, la mayoría es de carácter dominante a excepción de los microsatélites ya que éstos son codominantes. Por ello son utilizados ampliamente para medir la diversidad en Chile (Equiarte et al., 2007).

### 3.3.4.1 Análisis estadístico de marcadores moleculares

Como se mencionó anteriormente de acuerdo con el objetivo de la caracterización se definirá la UBC, De igual manera los análisis estadísticos multivariados a utilizar serán definidos por la naturaleza de los datos. Los principales análisis estadísticos que se utilizan son el análisis cluster y los análisis factoriales (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

La caracterización en marcadores moleculares mediante el análisis clúster dependerá de la naturaleza de los datos. Si son huellas moleculares de presencia / ausencia, son datos doble estado que presentan distribución binomial y los cálculos estadísticos deben hacerse con fórmulas elaboradas para esta distribución. Si se tienen frecuencias alélicas o génicas en una población lo suficientemente grande, se puede realizar una caracterización genética (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011). Si se tienen secuencias de ADN o proteínas se han desarrollado métodos apropiados para analizarlos, este tipo de datos se usan principalmente para estudios filogenéticos y algunos aspectos taxonómicos (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011). El análisis clúster como ya se hizo mención en el análisis estadístico de marcadores morfológicos, consta de dos métodos o pasos, el primero es el cálculo de los índices de similitud o disimilitud y el segundo es el método de aglomeración (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

De entre los índices de similitud que se deben usar para datos de presencia / ausencia como lo son algunos marcadores moleculares, destaca el de Dice, principalmente porque una concordancia por doble ausencia de una banda puede no serla (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011). Para conocer la disimilitud se pueden usar las distancias genéticas, pero sólo aplica para marcadores moleculares de una población en donde se conozcan el número de *loci* a analizar, así como el número de *locus* (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011). Dentro de las distancias genéticas la más utilizada es la fórmula original de Nei. Una vez obtenida la matriz de similitud o disimilitud se procede al método de aglomeración (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

Con respecto a los dos métodos de aglomeración, los jerárquicos son más usados que los no jerárquicos. El método jerárquico de mayor uso es el de media aritmética no ponderada (UPGMA), donde el recálculo de la matriz de distancias o de índices de similitud se lleva a cabo promediando los valores de las distancias o de los índices de similitud de las UBC's del nudo o grupo con el de las otras UBC's (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

Por último, se definirá la altura de corte del dendrograma obtenido para generar los grupos, se puede hacer uso de pruebas pseudoestadísticas para tal fin, pero de preferencia el investigador debe usar su experiencia en estudios similares para determinar la altura de corte (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).

Los análisis factoriales se usan para reducir información englobada en una serie de variables originales en una serie más pequeña de dimensiones compuestas o valores teóricos nuevos, con una pérdida mínima de información. Para el caso de huellas moleculares con marcadores dominantes (presencia / ausencia) se recomienda el uso de coordenadas principales (Acop) ya que es una modalidad de los análisis factoriales que se usa exclusivamente para datos binomiales (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2014). El Acop te permite visualizar una representación bi o tridimensional de las UBC en un plano reducido (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2014).

En los estudios analizados en este trabajo sobre la diversidad de chiles mediante marcadores moleculares, una vez que se obtuvieron los patrones de las bandas de las accesiones en geles de agarosa, se construyó una MBD. Para el método de similitud o disimilitud Contreras-Toledo et al. (2011) utilizaron la distancia genética de Rogers mientras que Hernández-Peña (2019) utilizó el índice de similitud de Dice, por otro lado Bobadilla-Larios utilizaron el índice de similitud de Jaccard. En el método de conglomerados en las tres investigaciones se utilizó el UPGMA para generar el dendrograma (Contreras-Toledo et al., 2011; Bobadilla-Larios et al., 2017; Hernández-Peña, 2019). Cuando se realizan caracterizaciones que involucran diferentes especies de Chile (*C. annumm*, *C. chinense*, *C. frutescens*) el dendrograma obtenido permite evaluar la diversidad genética entre especies y así

como la observada dentro de especies, encontrándose que la especie *Capsicum annuum* es la que presenta mayor diversidad (Troconis-Torres et al., 2012).

Dentro de la especie los chiles criollos cultivados de manera tradicional (Bobadilla-Larios et al., 2017), así como los chiles silvestres y semi domesticados como el tipo chiltepín presentan la mayor variabilidad genética (Hernández-Peña, 2019).

#### **3.3.4.2 Marcadores moleculares en chile de agua**

En el primer estudio con marcadores moleculares se hizo para observar la diversidad genética de chiles domesticados y semi-silvestres, donde se utilizaron un total de 80 accesiones de México (58 semi-silvestres y 22 domesticadas). No obstante, se encontró que de las 22 accesiones de chiles domesticados sólo dos corresponden a chile 'de agua'. Los marcadores utilizados fueron SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Los autores encontraron una reducción promedio del 10 % en la diversidad de chiles domesticados en relación con los semi-silvestres (Aguilar-Meléndez et al., 2009).

En otro estudio, Taitano et al. (2019) genotiparon por secuenciación (GBS) SNP, 103 accesiones de semillas de chile de 22 variedades locales provenientes de 27 localidades en el sur de México. De estas accesiones 34 corresponden a chile 'de agua' y no obstante que no se hizo caracterización morfológica, se apreció que el chile 'de agua', al ser un material cultivado presentó frutos largos con forma triangular similar, con grandes lóculos truncados que se estrecharon en un punto distal que era romo o ligeramente hundido. El análisis por GBS SNP identificó tres subpoblaciones principales entre las accesiones cultivadas, Tusta, Costeño y Chile 'de agua'. Con respecto a chile 'de agua' se observó que, a pesar de haber sido colectados sólo en los Valles Centrales, las diversas poblaciones parecen haber conservado la diferenciación espacial entre ellas; sin embargo, de acuerdo con el GBS SNP la diversidad genética fue más baja dentro de las variedades locales cultivadas de Costeño y Chile 'de agua' en comparación con las otras variedades locales de *C. annuum*.

### **3.3.5 Marcadores morfológicos y moleculares**

En estudios sobre diversidad en Chile en México (Alonso et al., 2012) y otros países (Dias et al., 2013) se ha optado por utilizar tanto marcadores morfológicos como moleculares. En los marcadores morfológicos se emplearon los descriptores propuestos por el IPGRI (1995) mientras que para los marcadores moleculares se utilizaron tipo ISSR's. En los dendrogramas realizados con los caracteres morfológicos se presentaron diferentes grupos, mientras que en los dendrogramas hechos a partir de los marcadores moleculares se observó menos grupos y accesiones similares, lo cual indica que la variación fenotípica puede deberse a factores ambientales ya que la caracterización se hizo *in situ* (Alonso et al., 2012).

### **3.3.6 Otros aspectos para conocer la diversidad de chiles**

La diversidad de chiles en México además de depender de factores ambientales y geográficos también depende del hombre. Al respecto Votava et al. (2005) señalaron que en cada región se realizan procesos de selección natural y artificial por cada agricultor posible razón para encontrar dicha heterogeneidad. El mayor porcentaje de colectas y de morfotipos en traspatio, indica que la mayor diversidad de chiles se cultiva para autoconsumo. Una parte importante en los procesos de conservación *in situ* es conocer y comprender los factores que influyen en la toma de decisiones de los campesinos para seguir conservando sus recursos genéticos. Los agricultores basan la selección de su germoplasma en el tamaño del fruto, sabor, tolerancia a plagas y enfermedades, y usos culinarios (Latournerie et al., 2001). Se han llevado a cabo investigaciones para conocer la diversidad de chiles, no sólo con base en caracterizaciones morfológicas o moleculares sino tomando en cuenta otros parámetros como usos, costumbres y tradiciones de las poblaciones en donde se cultivan los chiles, para ello se han basado en encuestas descriptivas (Castellón-Martínez et al., 2012; Montañaño-Lugo et al., 2014; Hernández-Peña, 2019).

### **3.3.6.1 Aspectos etnobotánicos del chile ‘de agua’**

Sólo se han publicado tres estudios que mediante entrevistas a productores y consumidores exploran cuestiones etnobotánicas del cultivo. Montañaño-Lugo et al. (2014) realizaron entrevistas a productores y consumidores de chile ‘de agua’ de ocho localidades de los Valles Centrales, del que concluyen cinco usos: comestible 45 %, medicinal 36 %, ritual 9 %, amuleto 6 % y ornamental 4 %. Observaron que los productores conocen más sobre el uso medicinal, ritual y amuleto; mientras que los consumidores sobre el uso comestible y medicinal.

El 60 % de los entrevistados afirma que el cultivo es una especie endémica de la región y el resto, empíricamente, saben que sólo en esta región se cultiva. El 100 % coincide que el nombre se debe a que requiere mucha agua para su producción (Montañaño-Lugo et al., 2014).

Por su parte Aparicio-del-Moral et al. (2013) encontró que los productores tienen una media de 61 años y el 90 % sólo tiene primaria. La superficie sembrada por productor va de 0.095 a 0.75 ha. El 25 % de productores siembra dos ciclos al año debido a las enfermedades y el alto costo de insumos.

En esta región, los productores seleccionan su semilla desde hace 32 años y usan insumos siguiendo la recomendación de otros productores y casas comerciales. Se utilizan alrededor de 228 jornales por hectárea por ciclo y el rendimiento es de 3.5 a 6.34 t ha<sup>-1</sup> (Aparicio-del-Moral et al., 2013).

Se vende por canastos de 35 kg y el precio varía con la época del año y calidad del producto. El número de canastos por hectárea es de 21, 37 y 54 de primera, segunda y tercera calidad, la producción se comercializa en la central de abastos de Oaxaca o en mercados locales (Aparicio-del-Moral et al., 2013).

En el tercer estudio, Castellón-Martínez et al. (2012) realizaron entrevistas en los Valles Centrales para conocer las preferencias de consumo de chiles nacionales y regionales. Con respecto a los chiles en general consumen chile ‘Jalapeño’ (37.7 %), ‘Chile de Árbol’ (18.9 %), ‘Chile ‘de agua’ (15.8 %) y ‘Serrano’ (13.1 %). De los

chiles regionales prefieren ‘Chile ‘de agua’ (67.1 %), ‘Paradito’ (13.8 %) y ‘Tusta’ (8.2 %), por su sabor y grado de picor. Las formas preferidas de consumo son: en salsa (36.5 %), relleno (28 %), asado (21.9 %) o rebanado en rajadas (11.2 %). Las familias compran desde algunos frutos (62.3 %) hasta un kilogramo (27.3 %) por semana de chiles locales (Castellón-Martínez et al., 2012).

### **3.3.7 Investigaciones de carácter agronómico en chile ‘de agua’**

#### **3.3.7.1 Calidad de semilla en chile ‘de agua’**

Para tener buen rendimiento y frutos de chile de alta calidad se necesita semilla de buena calidad física y fisiológica (Heinz et al., 2014), tanto en variedades comerciales como en chiles criollos, donde elegir el momento oportuno de cosecha de la semilla incidirá en su calidad (Velasco, 2007; Ayala et al., 2014), por lo que es indispensable determinar el momento oportuno de cosecha de frutos destinados a semilla para garantizar su más alta calidad (Dias et al., 2006)

Con respecto a la calidad de semilla en chile ‘de agua’, se han llevado a cabo dos estudios para conocer algunos parámetros; en el primero se colectaron 14 accesiones de chiles nativos de los Valles Centrales de Oaxaca, con lo que se hizo un análisis de componentes principales (CP), de los cuales los dos primeros explicaron 98.36 % de la variabilidad. Las variables importantes en el CP1 fueron: peso de mil semillas, peso volumétrico y longitud de plántula y para el CP2 germinación con y sin envejecimiento acelerado (Carrillo et al., 2009; Sanjuan-Martínez et al., 2020).

La germinación del chile ‘de agua’ fue de 92.7 a 70 %, mientras que el peso de mil semillas de 6.24 a 4.84 g y la longitud de plántula de 7.76 a 5.90 cm (Carrillo et al., 2009). En el segundo estudio además de evaluar la calidad física y fisiológica de semilla del chile ‘de agua’, se evaluaron otros dos chiles nativos de Oaxaca, el chile ‘Huacle’ y ‘Pasilla’. Se encontró que el chile ‘Huacle’ fue más sobresaliente en parámetros de calidad, mientras que el chile ‘de agua’ fue el menos sobresaliente. Algunos parámetros de calidad en chile ‘de agua’ fueron: peso de mil semillas (4.48

g), porcentaje de germinación (51 %) y longitud de plántula de 5.89 cm (Sanjuan-Martínez et al., 2020). Como puede observarse se obtuvieron mejores parámetros de calidad en las accesiones del primer experimento, esto puede deberse a la heterogeneidad que existe dentro de la variedad de chile 'de agua' (Carrillo et al., 2009), la posición del fruto en la planta, así como a época de cosecha (Espíndola & Smirdele, 2014), ya que los dos experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones hidropónicas y en invernadero.

Bajo estas circunstancias es necesario realizar más estudios sobre la calidad de chile 'de agua' sobre todo a diferentes grados de madurez de la semilla con respecto a los días después de antesis, para observar si es posible adelantar la cosecha de la semilla, como se han hecho en otros tipos de chiles y especies (Ruiz & Parera, 2017).

### **3.3.7.2 Calidad del fruto de chile 'de agua'**

En la actualidad además de la apariencia de los frutos de las hortalizas, los consumidores buscan compuestos en los productos que les ayuden a promover su salud (Pérez et al., 2018). En chiles como el pimiento se sabe que además de su valor nutritivo tiene vitaminas C, A, B; además de compuestos antioxidantes como flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides (Cheema et al., 2018).

Respecto al chile 'de agua' se han hecho pocos estudios sobre la calidad del fruto (Vera-Guzmán et al., 2011;). Sólo uno de ellos se ha enfocado exclusivamente al fruto, comparándolo con frutos de otros ocho morfotipos de chiles entre silvestres y cultivados. Los parámetros de calidad se midieron en frutos maduros y verdes de estos tipos de chiles.

En el chile 'de agua' se encontró que el fruto verde tiene 90 mg de vitamina C, 180.4 mg de fenoles totales y 44.4 mg de flavonoides por cada 100 g de fruto. Mientras que el fruto maduro tiene 15.2 mg/100 g de carotenoides, 4.9 µg/1 mL de capsaicina y 1.6 µg/1 mL de dihidrocapsaicina (Vera-Guzmán et al., 2011)

En otros estudios sólo se evaluaron indirectamente algunos parámetros de calidad, tal es el caso de Sanjuan (2020) quien midió grados Brix en fruto y su longitud, obteniendo 5.3 y 10.5 cm, respectivamente. Por su parte Castellón et al. (2014) encontraron en promedio 5.02 grados brix, pH: 5.0 y una longitud de chile de 5.40 cm.

En el caso de Cruz-Andrés et al. (2018) midieron algunos componentes bioactivos de acuerdo con diferentes cubiertas de macrotúneles, encontraron que el plástico verde incrementó la concentración de fenoles totales y capacidad antioxidante, superando al testigo (campo abierto). La concentración de flavonoides totales de los frutos cultivados en campo abierto fue mayor en al menos 47 % a los materiales con cubierta.

De este modo falta investigar sobre los parámetros de calidad en frutos de chile 'de agua', especialmente basándose en la madurez de los frutos con respecto a los días después de antesis ya que es una manera más objetiva de medir estos parámetros, tal como se ha hecho en otros cultivares (Soethe et al., 2016).

### **3.3.7.3 Demanda nutrimental**

Saber los requerimientos nutrimentales de acuerdo con la fenología de las plantas conduce a hacer un uso eficiente de los fertilizantes y a obtener los máximos rendimientos del cultivo (Castro et al., 2004).

Para conocer la demanda nutrimental de la planta de chile se hizo un estudio en una accesión de Ocotlán puesta bajo invernadero en un sistema hidropónico. Se determinó que la presión osmótica de 0.054 es la adecuada para mayor rendimiento del cultivo. La extracción nutrimental ( $\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$ ) fue de 16.93, 1.12, 16.62, 3.54 y 1.27 de N, P, K, Ca y Mg. Mientras que la cantidad necesaria de nutrimentos para producir una tonelada de fruto es de 7.7, 0.5, 7.64, 1.6 y 0.6 kg de N, P, K, Ca y Mg. Se encontró que la máxima tasa de absorción de nutrimentos se presentó durante la fructificación (Valentín-Miguel et al., 2013).

#### **3.3.7.4 Etiología de la marchitez del chile ‘de agua’**

Dentro de las enfermedades del chile en general existe la llamada marchitez, a la cual el chile ‘de agua’ también es susceptible (Velasquez-Valle et al., 2013). No obstante, al no tener certeza del patógeno que la provocaba, Vázquez-López et al. (2009) de una investigación concluyeron que, en plántulas de 5 días de edad, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina* spp., *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. (*binucleada*) y *R. solani* causaron estrangulamiento y necrosis del cuello de la raíz (ahogamiento) y muerte de plántulas. Mientras que en plantas de 45 días de edad observaron que *P. capsici* y *R. solani* causaron marchitez, necrosis de cuello de raíz y tallo sin desprendimiento de epidermis y muerte de planta a 6 días después de la inoculación (Vázquez-López et al., 2009).

#### **3.3.7.5 Poda en chile ‘de agua’**

En los últimos años los productores se han enfrentado a múltiples problemas como bajos rendimientos y calidad del producto, escasa resistencia o tolerancia a factores bióticos adversos, principalmente plagas y enfermedades (López et al., 2005), además de bajos precios por la concentración de la producción en épocas bien definidas. Por esta problemática López & Rodríguez (2019) realizaron la evaluación de la línea sobresaliente de chile ‘de agua’ VCCHAGUA 005, en condiciones de ambiente protegido, riego presurizado por goteo y poda tipo español a 4 tallos. El material VCCHAGUA 005, produjo en promedio 16.80 t ha<sup>-1</sup>, rendimiento que supera al tratamiento testigo obtenido de semilla criolla con 3.20 t ha<sup>-1</sup> y hasta con 10.50 t ha<sup>-1</sup> el rendimiento promedio regional (6.30 t ha<sup>-1</sup>).

### **3.4 CONCLUSIONES**

La diversidad de los chiles cultivados y silvestres en México es amplia debido a las condiciones orográficas presentes en el país que han permitido que este género se haya diversificado a lo largo de los siglos, aunado a aspectos de cultura y tradición.

El chile ‘de agua’ presenta alta variabilidad fenotípica y se han hecho esfuerzos para conocerla y conservarla, sin embargo, no se han realizado estudios que contemplen

un alto número de accesiones que provengan de la mayoría de las regiones que componen a los Valles Centrales por lo que resulta conveniente seguir realizando investigaciones en este cultivo.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L., & 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:10.3732/ajb.0800155>
- Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., López-López, P., Latournerie-Moreno, L., Ramírez-Meraz, M., Villalón-Mendoza H., & Aguilar-Castillo J. A. (2010). Los Chiles de México y Su Distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN.
- Aguilar R., V. H., T. Corona T., & S. H. Morán B. (2006). Chiles criollos (*Capsicum* spp., *Solanaceae*) de los estados de Puebla y Morelos. In: P. López L. y S. Montes H. (eds.), *Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI*, Libro Científico Núm. 1 (pp: 28-58.). INIFAP.
- Aguirre-Mancilla, CL., Iturriaga-De la Fuente G., Ramírez-Pimentel J.G., Covarrubias-Prieto J., Chablé-Moreno F., & Raya-Pérez J.C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria México*, 5(1), 19-31.
- Alonso, B. R. A., Zambrano, C. B., Quiroga M. R., Rosales E. M. A., & Ponce D. P. (2012). Caracterización morfológica y molecular de la variabilidad genética del timpinchile (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum* sin. *aviculare*) en Chiapas. *Quehacer Científico en Chiapas*, 1(13), 4-18
- Aparicio-del Moral, J. O., Tornero-Campante, M. A., Sandoval-Castro, E., Villarreal-Manzo, L. A., & Rodríguez-Mendoza, M. (2013). Factores sociales y económicos del Cultivo de Chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.) en tres municipios de los Valles Centrales de Oaxaca. *Ra Ximhai*, 9(1), 17-24.
- Ayala, V. M. J., Ayala, G. O. J., Aguilar, R. V. H., & Corona, T. T. (2014). Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annuum* L. durante su desarrollo en el fruto. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(1), 79-87.
- Bobadilla-Larios, V., Esparza-Ibarra, E., Delgadillo-Ruiz, L., Gallegos-Flores, P., & Ayala-Lujan, J. L. (2017). Variedades de chile (*Capsicum annuum* L.)

- identificadas mediante marcadores RAPD. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3), 465-473.
- Barrantes, J. L. (2010). *Manual de Recomendaciones en el Cultivo de Chile, Pimentón o Ají* (Folleto Técnico). MAG/INTA.
- Bojacá, C. R., Monsalve, O., Casilimas, H., Gil, R., Villagrán, E., Arias, L. A., & Fuentes, L. S. (2012). *Manual de Producción de Pimentón Bajo Invernadero*. Tadeo Lozano.
- Bosland, P. W., Votava, E. J., & Votava, E. M. (2012). *Peppers: vegetable and spice capsicums* (2<sup>nd</sup> ed.). Cabi.
- Carrillo, E. P., Mejía-Contreras, J. A., Carballo-Carballo, A., García-de los Santos, G., Aguilar-Rincón, V. H., & Corona-Torres, T. (2009). Calidad de semilla en colectas de chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.) de los Valles Centrales de Oaxaca, México. *Agricultura Técnica en México*, 35(3), 257-266.
- Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Mendoza-Elos, M., Vargas-López, A., & Cárdenas-Morales, H. (2008). Colección y caracterización de chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Phyton*, 77, 189-202.
- Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Leshner-Gordillo, J. M., De la Cruz-Lázaro, E., & Mendoza-Elos, M. (2010). Identificación de variables para caracterizar morfológicamente colectas de chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 26(3), 225-234.
- Castellón-Martínez, É., Chávez-Servia, J. L., Carrillo-Rodríguez, J. C., & Vera-Guzmán, A. M. (2012). Preferencias de consumo de chiles (*Capsicum annuum* L.) nativos en los Valles Centrales de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(5), 27-35.
- Castellón-Martínez, E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chavez-Servia, J. L., & Vera-Guzmán, A. M. (2014). Variación fenotípica de morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) nativo de Oaxaca, México. *Phyton*, 83(2), 225-236.
- Castro, B. R., Galvis, S. A., Sánchez, G. P., Peña, L. A., Sandoval, V. M., & Alcántar, G. G. (2004). Demanda de nitrógeno en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 147-152.
- Cheema, A., Padmanabhan, P., Amer, A., Parry, M. J., Lim, L. T., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2018). Postharvest hexanal vapor treatment delays ripening and enhances shelf life of greenhouse grown sweet bell pepper (*Capsicum annuum*

L.). *Postharvest Biology and Technology*, 136, 80-89.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.006>

Chew, M. Y. I., Vega, P.A., Palomo, R. M., & Jiménez, D. F. (2008). *Principales enfermedades del chile (Capsicum annuum L.)*, Folleto Técnico No 15. INIFAP.

Contreras-Toledo, A. R., López-Sánchez, H., Santacruz-Varela, A., Valadez-Moctezuma, E., Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., & López, P. A. (2011). Diversidad genética en México de variedades nativas de chile 'poblano' mediante microsatélites. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(4), 225-232.

Cruz-Andrés, O. R., Pérez-Herrera, A., Martínez-Gutiérrez, G. A., & Morales, I. (2018). Cubiertas de macrotúneles y su efecto en las propiedades nutraceuticas del chile 'de agua'. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(4), 555-558.

Dias, D. C. F. S., Ribeiro, F. P., Dias, L. A. S., Silva, D. J. H., & Vidigal, D. S. (2006). Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. *Seed Science and Technology*, 34(3), 691-699.

Dias, G. B., Gomes, V. M., Moraes, T. M., Zottich, U. P., Rabelo, G. R., Carvalho, A. O., & Da Cunha, M. (2013). Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research*, 12, 6488-6501. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.February.28.29>

Eguiarte L., Souza, V., & Aguirre X. (2007). *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Espíndola, L. J. M., & Smirdele, O. J (2014). Physiologic quality of pepper seeds obtained from to fruit maturation and storage and storage. *Ciências Agrárias*, Londrina, 35 (1), 251-258. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n1p251>

Garza, U. E. (2021). *El barrenillo del chile Anthonomus eugenii y su manejo en la planicie Huasteca* (Folleto técnico 4). INIFAP.

Heinz-Castro, R. T. Q., Marín-Sánchez, J., & Alvarado-Gómez, O. G. (2014). Incremento de la calidad sanitaria y fisiológica en semilla de chile poblano (*Capsicum annuum L.*). *Fitosanidad*, 18(3), 169-173.

Hernandez-Peña, R. (2019). Caracterización molecular y aproximación etnobotánica del chile Chiltepín (*Capsicum annuum L. var. glabriusculum*) de la vertiente oriental de México. Tesis de maestría. Instituto de Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

- Hernández-Verdugo, S., Porras, F., Pacheco-Olvera, A., López-España, R. G., Villarreal-Romero, M., Parra-Terraza, S., & Osuna-Enciso, T. (2012). Caracterización y variación ecogeográfica de poblaciones de chile (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) silvestre del noroeste de México. *Polibotánica*, (33), 175-191.
- Hidalgo, R. (2003). Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In Franco, T. L. & Hidalgo, R. (Eds.) *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos* -Boletín Técnico 8 (pp. 2-26). IPGRI.
- IPGRI (1995). *Descriptors for Capsicum spp.* Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI).
- Latournerie, L., Chávez, J. L., Pérez, M., Hernández, C. F., Martínez, R., Arias, L. M., & Castañón, G. (2001). Exploración de la diversidad morfológica de chiles regionales en Yaxcabá, Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana*, 12(1), 41-47.
- Lesur, L. (2006). *Una Guía Paso a Paso: Manual del Cultivo del Chile*. Trillas.
- López, L. P. (2007). El chile 'de agua': un chile típico de los Valles Centrales de Oaxaca. Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca, México: INIFAP-CRUSO.
- López, L. P., & Rodríguez Hernández, R. (2019). Evaluación de chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.) en ambiente protegido y poda en los valles centrales de Oaxaca. In Meza V. V. M. y Chay C. A. J. (Eds.) *Producción Agropecuaria: Un enfoque integrado* (47-52). Oaxaca, México: UNPA.
- Martínez-Sánchez, D., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Pérez, J. E., Pérez, M., & del Carmen, E. (2010). Colecta y caracterización morfológica de 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 16(3), 169-176.
- Montaño-Lugo, M. L., Velasco-Velasco, V. A., Ruíz-Luna, J., Ángeles, C., Virginia, G., Rodríguez-Ortiz, G., & Martínez-Martínez, L. (2014). Contribución al conocimiento etnobotánico del chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en los Valles Centrales de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(3), 503-511.
- Namesny, A. (2006). *Pimientos. Compendios de Horticultura* (2da ed.). Horticultura SL Reus

- Narez-Jiménez, C. A., de la Cruz-Lázaro, E., Gómez-Vázquez, A., Castañón-Nájera, G., Cruz-Hernández, A., & Márquez-Quiroz, C. (2014a). La diversidad morfológica *in situ* de chiles silvestres (*Capsicum* spp.) de Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(3), 209-215.
- Narez-Jiménez, C. A., de la Cruz-Lázaro, E., Gómez-Vázquez, A., Márquez-Quiroz, C., & García-Alamilla, P. (2014b). Colecta y caracterización morfológica *in situ* de chiles (*Capsicum* spp.) cultivados en Tabasco, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 20(3), 269-281.
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía mesoamericana*, 22(2), 415-427.
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2014). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 1(1), 1-6.
- Nuez, F., Ortega, G., & Costa, R. (2003). *El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes* (3ra Ed.). Mundi Prensa.
- Peña-Caballero, V., Morales-Vargas, A. T., & Núñez-Colín, C. A. (2020). Eigenanálisis aplicado a diferentes áreas de las ciencias agrícolas y biotecnología: una revisión. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 6(1).
- Pérez-Castañeda, L. M., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., & Mayek-Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 117-128.
- Pérez, G. M., Martínez, D. M. T., Oscar, C. A., Potrero, A, S. M., Aureliano, P. L., González, H. V. A., & Villegas, M. A. (2018). Content of Capsaicinoids and physicochemical characteristics of manzano hot pepper grown in greenhouse. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 119-127. <http://dx.doi.org/10.15835/nbha47111241>
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casas, A., & Castañeda-Sortibrán, A. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In Sarukhan J. (Ed.) *Capital Natural de México* (pp 437-494). CONABIO.

- Ramírez-Meraz, M., Villalón-Mendoza, H., Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., & Latournerie-Moreno, L. (2015). Caracterización morfológica de chiles silvestres y semidomesticados de la región huasteca de México. *Agroproductividad*, 8(1), 9-16.
- Rimieri, P. (2017). La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 28(2), 7-13.
- Ríos, E., Mejía-Ruiz, H., & Álvarez-Castañeda, S. T. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Comunicaciones Libres*. 5-13.
- Robles-Hernández, L., Gómez-Franco, A. C., Gill-Langarica, E. M., Pérez-Moreno, L., & López-Díaz, J. C. (2010). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *Tecnociencia Chihuahua*, 4(2), 72-86.
- Ruiz, M. B., & Parera, C. A. (2017). Effect of harvesting time on seed quality of two bell pepper cultivars (*Capsicum annuum*). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(2), 67-77.
- SanJuan-Martínez J., Ortiz-Hernández, Y., Ortiz-Hernández, F., & López-Cruz J. (2018). Desempeño *ex situ* de dos chiles nativos de Oaxaca. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 9(21), 349-359.
- Sanjuan Martínez, J. (2020) Características vegetativas y de frutos de tres tipos de chiles de Oaxaca producidos en invernadero. In Sandoval S. T. (Ed.), *Contribución al Conocimiento Científico y Tecnológico en Oaxaca*, (pp 50-59). CIIDIR.
- Sanjuan-Martínez, J., Ortiz-Hernández, Y. D., Aquino-Bolaños, T., & Cruz-Izquierdo, S. (2020). Seed and seedling quality of three chilis (*Capsicum annuum* L.) native to Oaxaca, Mexico. *Ciência Rural*, 50(9), 7. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190921>
- SIAP. (2021). Anuario estadístico de la producción agrícola. México. (Consultada en abril de 2021.) [http://nube.siap.gob.mx/cierre\\_agricola/](http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/).
- Soethe, C., Steffens, C. A., Mattos, L. M., Ferreira, N. A., & Mayer, D. M. (2016). Postharvest quality and functional compounds in 'dedo-de-moça' 'BRS Mari' pepper fruit at different stages of maturity. *Ciência Rural*, 46(8), 1322-1328. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141795>

- Taitano, N., Bernau, V., Jardón-Barbolla, L., Leckie, B., Mazourek, M., Mercer, K., ... & van der Knaap, E. (2019). Genome-wide genotyping of a novel Mexican Chile pepper collection illuminates the history of landrace differentiation after *Capsicum annuum* L. domestication. *Evolutionary Applications*, 12(1), 78-92. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12651>
- Toledo-Aguilar, R., López-Sánchez, H., López, P. A., Guerrero-Rodríguez, J. D. D., Santacruz-Varela, A., & Huerta-de la Peña, A. (2016). Diversidad morfológica de poblaciones nativas de chile poblano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1005-1015.
- Toquica, S. P., Rodríguez, F., Martínez, E., Duque, M. C., & Tohme, J. (2003). Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon department in Colombia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(6), 639-647.
- Troconis-Torres, I. G., Rojas-Lopez, M., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L., Maldonado-Mendoza, I. E., Dorantes-Alvarez, L., ... & Jaramillo-Flores, M. E. (2012). Biochemical and molecular analysis of some commercial samples of chilli peppers from Mexico. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/873090>
- UPOV. 2006. *Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad: ají, chile, pimienta*. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV).
- Valentín-Miguel, M. C., Castro-Brindis, R., Rodríguez-Pérez, J. E., & Pérez-Grajales, M. (2013). Extracción de macronutrimientos en chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 19(4), 71-78.
- Vásquez López, A., Tlapal Bolaños, B., Yáñez Morales, M., Pérez Pacheco, R., & Quintos Escalante, M. (2009). Etiología de la marchitez del chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 127-134.
- Velasco, V. V. A. (2007, abril 7). Selección de chiles 'de agua'. *Revista Agroproduce* (México), 16, 8-12.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., & Reveles-Hernández, M. (2013). *Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el norte centro de México* (Folleto Técnico Núm. 50). CIRNOC – INIFAP

- Vera-Guzmán, A. M., Chávez-Servia, J. L., Carrillo-Rodríguez, J. C., & López, M. G. (2011). Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, Mexico. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(4), 578.
- Votava, E. J., Baral, J. B., & Bosland, P. W. (2005). Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany*, 59(1), 8-17.

## **CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN CHILE DE AGUA (*Capsicum annuum* L.)**

### **4.1 RESUMEN**

El chile de agua (*Capsicum annuum* L.) es de los cultivos más importantes en los Valles Centrales de Oaxaca y en los sistemas agrícolas tradicionales ha conservado su variabilidad. Para hacer un uso sustentable de los recursos genéticos o para su conservación es necesario conocer su variabilidad genética, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la variabilidad genética de 55 accesiones de chile 'de agua' de los Valles Centrales y de la Mixteca de Oaxaca mediante su caracterización morfológica y molecular. La caracterización morfológica fue *ex situ* en invernadero utilizando los descriptores para *Capsicum* del IPGRI. La caracterización molecular se realizó con marcadores ISSR's con 18 iniciadores que produjeron 151 bandas, 118 de éstas polimórficas (82.12 %). Los análisis multivariados separaron cuatro grupos con descriptores morfológicos y cinco con marcadores moleculares, los cuales no estuvieron asociados con los orígenes de las accesiones. Los resultados muestran la existencia de una importante variabilidad genética en chile 'de agua'. Si se considera un futuro mejoramiento genético en este cultivo, las accesiones dentro del grupo tres de la caracterización morfológica muestran las mejores características deseables para los consumidores.

**Palabras clave:** criollos, polimorfismo, recursos genéticos, variabilidad.

## MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF 'DE AGUA' CHILI (*Capsicum annuum* L.)

### 4.2 ABSTRACT

The 'de agua' chili pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important crops in the Central Valleys of Oaxaca and into the traditional agricultural systems have preserved their variability. Either to make sustainable the use of genetic resources or for conservation purposes, it is necessary to know their genetic variability, then the objective of this research was to evaluate genetic variability of 55 'de agua' chili pepper accessions from the central valleys and the Mixteca of Oaxaca. The morphological characterization was *ex situ* in greenhouse conditions using the IPGRI descriptors for *Capsicum*. Molecular characterization was done using ISSR's markers with 18 primers; a total of 151 bands were obtained, 118 of them were polymorphic (82.12 %). Multivariate analyzes separated four groups with morphological descriptors and five with molecular markers, which were not associated with the origins of the accessions. Significant genetic variability was found in 'de agua' chili. If a future genetic breeding is considered in this crop, accessions grouped within group three of the morphological characterization had the most desirable traits for consumers.

**Index words:** landraces, polymorphism, genetic resources, variability.

### 4.3 INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) tiene su centro de domesticación en México y presenta una gran variedad de formas, colores y tamaño de fruto. Es posible encontrar diversos chiles domesticados, semi-domesticados y silvestres. Es necesario estudiar y preservar estos valiosos recursos genéticos ya que han disminuido sus poblaciones a causa de plagas y enfermedades, sustitución de cultivo e introducción de variedades mejoradas entre otros factores (Aguilar-Rincón et al., 2010; Aguirre-Mancilla et al., 2017).

En el país se ha realizado la exploración, colecta, identificación, caracterización morfológica y conservación *in situ* y *ex situ* de los recursos fitogenéticos silvestres y domesticados de las principales especies cultivadas de chile (Pérez-Castañeda et al., 2015); sin embargo, aún faltan más genotipos regionales por estudiar. Uno de éstos es el chile 'de agua', endémico de los Valles Centrales de Oaxaca considerado de gran importancia económica, social y consumo para dicha región (López et al., 2007).

Los sistemas agrícolas tradicionales han permitido conservar la variabilidad de este tipo de chile, para conocerla, se han realizado investigaciones mediante caracterización morfológica o molecular con un bajo número de accesiones, lo que limita conocer su variabilidad genética en forma precisa (Castellón-Martínez et al., 2014; Taitano et al., 2019). Por otro lado, usar sólo caracterización molecular no permite observar características de interés agronómico o antropocéntrico de las accesiones.

La caracterización morfológica y molecular estima con mayor exactitud la variabilidad genética de accesiones estudiadas y permite la conservación y uso sustentable de estos recursos genéticos. Por eso, el presente trabajo tuvo como objetivo conocer la variabilidad genética de 55 accesiones de chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.) provenientes de los Valles Centrales y la Mixteca de Oaxaca, a través de su caracterización morfológica y molecular.

#### 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se caracterizaron morfológica y molecularmente 55 accesiones de chile 'de agua', 42 originarias de seis distritos de los Valles Centrales de Oaxaca. Ejutla (C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C52, C53, C54) Ocotlán (C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C49), Zimatlán (C1, C2, C3, C4, C5, C27, C28, C29, C50, C55) Tlacolula (C30, C31, C32, C33, C34), Centro (C51) y Etna (C48), además de 13 accesiones de la Mixteca, de San Andrés Nuxiño (C35, C36, C37, C38, C39, C40, C41, C42, C43, C44, C45, C46 y C47).

La caracterización morfológica se hizo *ex situ* en el ciclo primavera verano de 2021 en un invernadero tipo túnel con estructura metálica, cubierta de polietileno y ventilación lateral, ubicado en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, con temperatura media anual 22 °C y humedad relativa de 67 %. Las accesiones se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con una mezcla de sustratos compuesta de turba y perlita (2:1). Las plantas se trasplantaron a los 50 días después de la siembra, se usaron bolsas de polietileno negro de 15 litros, con tezontle rojo de textura media como sustrato, a una distancia de 0.3 m entre bolsas y 0.5 entre líneas, lo que correspondió a una densidad de 6 plantas m<sup>-2</sup>. El riego se aplicó con cintilla de 16 mm de diámetro y se usó la solución nutritiva propuesta por Sánchez & Escalante (1989). La unidad experimental consistió en una maceta por planta, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones.

La caracterización morfológica se hizo mediante la medición de 70 descriptores de la guía para *Capsicum* del IPGRI (1995). La caracterización molecular se llevó a cabo en el 2022, en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la misma institución. La extracción de ADN de las accesiones se realizó con el protocolo detallado por Wagner et al. (1987). Para cuantificar y determinar la pureza de ADN obtenido en ng·µL<sup>-1</sup>, se utilizó un espectrofotómetro "NanoDrop Lite" de "Thermo Scientific". La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 0.8 % mediante electroforesis con 150 voltios durante 40 minutos. El gel se tiñó con solución de bromuro de etidio (0.5 µg·µL<sup>-1</sup> en TAE 1 X) por 15 minutos. Después se documentó

mediante un transluminador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP. Se realizaron las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa con 18 iniciadores (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Secuencia y temperatura de alineamiento de 18 iniciadores ISSR.

Iniciador	Secuencia	Temperatura de alineamiento °C
ISSR1	(CA) <sub>8</sub> AAGG	60
ISSR3	(CA) <sub>8</sub> AAGCT	58
ISSR4	(AG) <sub>8</sub> CTC	58
ISSR5	(CA) <sub>8</sub> CTA	60
ISSR6	(AC) <sub>8</sub> CTG	59
ISSR7	(AG) <sub>8</sub> CTG	53
ISSR8	(AC) <sub>8</sub> CTT	56
ISSR9	(AG) <sub>8</sub> C	50
ISSR10	(GA) <sub>8</sub> T	50
A1	(CA) <sub>6</sub> AG	48
LOL8	(GT) <sub>6</sub> CC	56
MELS 2	(GA) <sub>6</sub> GG	56
PHV6	(CT) <sub>8</sub> CCA	60
PI01	(CA) <sub>6</sub> AGCT	48
PI02	(CA) <sub>6</sub> AGG	56
PI03	(GACA) <sub>3</sub> AGCT	48
PI04	(CT) <sub>8</sub> AGC	58
UBC844	(CT) <sub>8</sub> AC	54

Para cada accesión se marcó un microtubo Eppendorf, se agregó 2.5 µL de ADN diluido a 10 ng·µL<sup>-1</sup> y 22.5 µL de mezcla de reacción para tener un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción consistió de: 5.2 µL de H<sub>2</sub>O grado Biología Molecular, 10 µL de dNTP's (500 µM), 2.5 µL de amortiguador (10 x), 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 3.0 µL de iniciador ISSR (10 ng·µL<sup>-1</sup>), 0.3 µL de enzima Taq DNA polimerasa (5 u·µL<sup>-1</sup>), y 2.5 µL de ADN (10 ng·µL<sup>-1</sup>). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo F TC41H2D marca TECHNE, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 93 °C por 1 min; cuarenta ciclos de desnaturalización

cada uno con: 20 s a 93 °C, 60 s a la temperatura de alineamiento del iniciador (Cuadro 1) y 20 s a 72 °C para extensión final a 72 °C por 6 min. Para finalizar la muestra se enfrió hasta 10 °C. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 150 V por 40 min, teñidos con bromuro de etidio durante 15 minutos y se documentaron mediante un transluminador y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP. El análisis de los geles se realizó al comparar las similitudes de los patrones de bandeo al asignar el valor 0 a la ausencia y 1 a la presencia de cada banda. Se cuantificó el número de bandas polimórficas; cada banda se identificó de acuerdo con la distancia de migración en el gel. Al final se construyó una matriz básica de datos.

Con los resultados obtenidos a partir de los caracteres morfológicos, se eligieron las variables cuantitativas más útiles para discriminar colectas a partir de análisis de covarianzas sucesivas. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de agrupamiento a partir de la matriz de distancias euclidianas y el algoritmo de mínima varianza de Ward, la altura de corte se eligió mediante el criterio cúbico de agrupamiento (Statistical Analysis System [SAS], 1983), la pseudo estadística  $t^2$  (Hotelling, 1951) y la pseudo F (Johnson, 1998). Para corroborar la agrupación generada y conocer los caracteres responsables, se hizo un análisis discriminante en cual se consideró como variable categórica los grupos generados.

Con la matriz básica de los datos moleculares mediante el programa InfoGen (Balzarini & Di Rienzo, 2003) se realizó el análisis descriptivo para marcadores; la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo (PDICMA) se calculó con la fórmula  $P_i(XD)^n$ , donde (XD) representa el índice de similitud promedio para todos los pares de comparaciones, calculado como  $XD = (2NAB) / (NA + NB)$ , NAB representa el número de bandas presentes en ambas muestras, NA y NB representan el número total de bandas en las muestras A y B respectivamente, y n representa el número promedio de productos de amplificación por muestra (Wetton et al., 1987). El contenido de información polimórfica (PIC) se calculó con la fórmula:  $2 \sum_{i=2}^1 \sum_{j=1}^{i-1} [p_i p_j (1 - p_i p_j)]$ . Asimismo, se obtuvo la matriz de disimilitud de Jaccard (1912) y se realizó un análisis de agrupamiento mediante el algoritmo de

agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) con el programa SAS. Por último, con el programa R se hizo una prueba de Mantel con 1000 permutaciones para determinar la correlación entre las matrices de distancia (morfológica) y disimilitud (molecular).

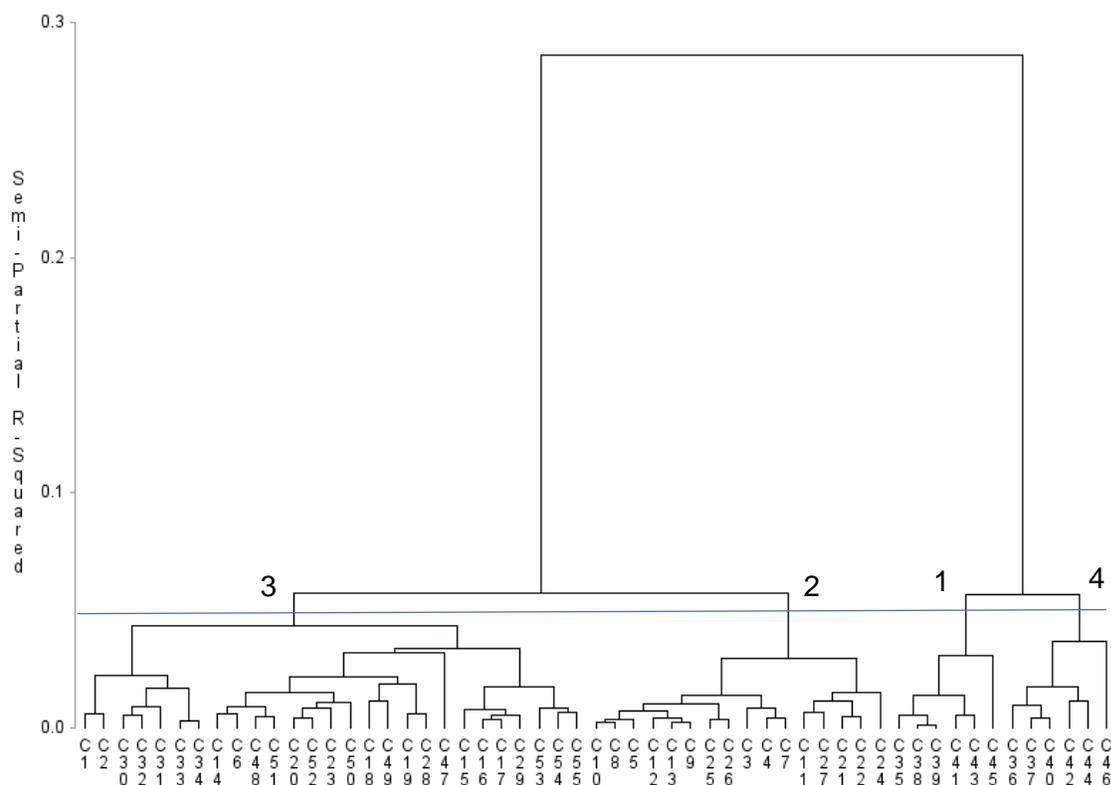
## 4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el análisis se tomaron en cuenta 37 descriptores, de los cuales 23 fueron cuantitativos, el resto fueron constantes y se descartaron. Con el análisis de covarianza se redujo la dimensionalidad de la matriz de datos al identificar 19 descriptores cuantitativos de mayor importancia para discriminar accesiones: longitud y ancho de hoja cotiledónea, longitud de hipocótilo, longitud de pétalo, longitud de filamento y antera, número de pétalos, longitud, ancho y peso de fruto, longitud de placenta, grosor de pericarpio, número de lóculos, altura de planta, días a floración, días a fructificación, longitud de hoja, ancho de hoja y frutos por planta. Estos 19 descriptores cuantitativos junto a los 14 cualitativos restantes fueron utilizados para realizar el análisis de agrupamiento y construcción del dendrograma. Los resultados obtenidos muestran que los caracteres de planta con mayor variabilidad fueron de fruto, flor y hojas, que además fueron los más útiles para la discriminación entre accesiones, resultados que coinciden con lo obtenido en otras investigaciones donde en el género *Capsicum* la mayor variación morfológica se presenta en el ancho, largo y peso del fruto, largo, ancho y forma de la hoja, color de flor y número de pétalos, entre otros (Martínez-Ispizua et al., 2022; Tsonev et al., 2017).

### 4.5.1 Caracterización morfológica

El dendrograma construido con el algoritmo de mínima varianza de Ward, con altura de corte de 0.04  $r^2$  semiparcial, determinada a partir del criterio cúbico de agrupamiento, la pseudo F y la pseudo  $t^2$ , definió que el número de grupos adecuados son cuatro, que incluyen 27, 16, 6 y 6 accesiones (Figura 1). Estos resultados sugieren que la variedad chile 'de agua' presenta mayor variabilidad morfológica comparada con otro tipo de variedades de *C. annum* y otras especies

cultivadas del género *Capsicum*; en otras investigaciones considerando de 19 hasta 60 accesiones de diferentes variedades de *C. annuum* y en otras especies como *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, se obtuvo la formación de dos a cuatro grupos (Carvalho et al., 2014; Martinez et al., 2017; Tsonev et al., 2017).



**Figura 1.** Dendrograma jerárquico de caracteres morfológicos de *Capsicum annuum*, derivado de distancias euclidianas y algoritmo de mínima varianza de Ward. C: colecta

En el análisis discriminante se consideró como variable categórica los cuatro grupos obtenidos. Se generaron tres variables discriminantes (VD) y con dos se explicó el 95.4 % de la variabilidad observada, 87 % con la primera y 8.4 % con la segunda, respectivamente. La estructura canónica total indicó las asociaciones lineales entre las funciones discriminantes generadas y los 19 caracteres usados en el análisis. La VD1 está asociada negativamente con el ancho, peso de fruto y longitud de hoja y en forma positiva con longitud de antera y frutos por planta, mientras que la VD2 tuvo asociación positiva con altura de planta. Con base en las dos VD, se pueden

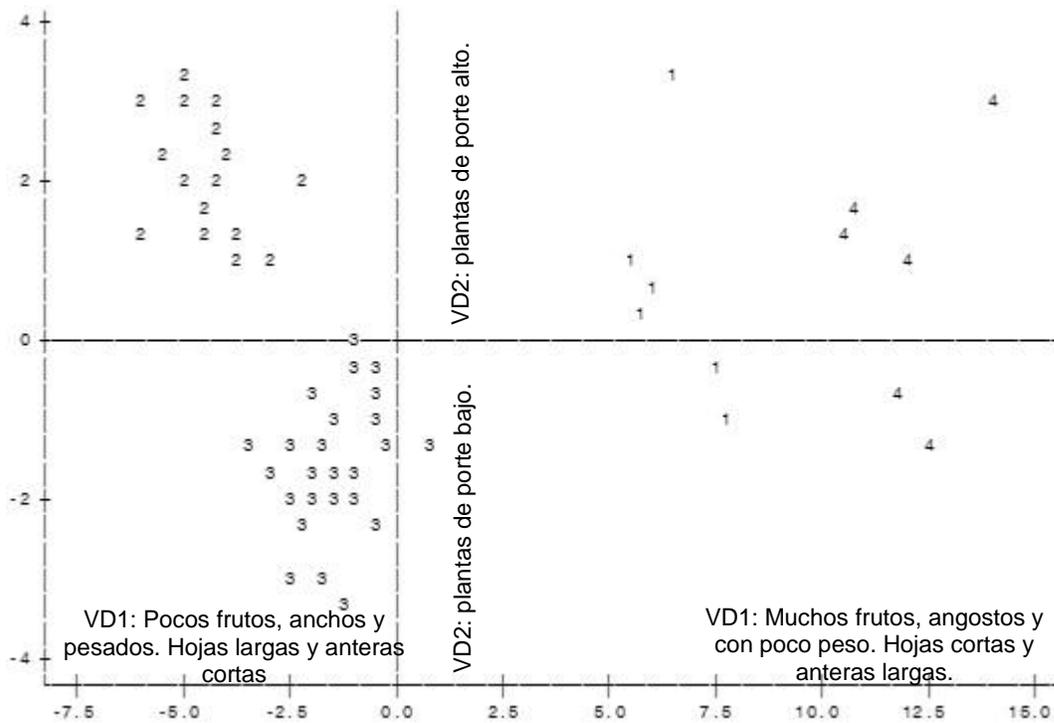
observar las características morfológicas de los grupos generados y las accesiones que los conforman (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Grupos de las accesiones de ‘chile de agua’ obtenidos mediante la caracterización morfológica utilizando análisis multivariados de agrupamiento y discriminante.

Grupo	Frecuencia	Colecta	Características
1	6	35, 38, 39, 41, 43, 45	Plantas de porte alto a intermedio, con muchos frutos angostos de poco peso, hojas cortas y anteras largas.
2	16	3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 21, 22, 24, 25, 26, 27	Plantas altas con pocos frutos, más anchos y pesados hojas más largas y anteras cortas.
3	27	1, 2, 6, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	Plantas de porte bajo, con pocos frutos anchos y pesados, hojas largas y anteras cortas.
4	6	36, 37, 40, 42, 44, 46	Plantas de porte alto a intermedio, con muchos frutos muy angostos de menor peso, hojas cortas y anteras largas.

A partir de los valores de VD1 y VD2 asignados a cada accesión, se verifica la conformación de grupos obtenidos en el análisis de agrupamiento. El grupo 1 estuvo constituido por plantas de porte alto a intermedio con frutos delgados de poco peso, pero con muchos frutos por planta.

El grupo 2 presentó plantas de porte alto con frutos anchos y de mayor peso, pero pocos frutos por planta. En el grupo 3 las plantas fueron de porte bajo, con ancho y peso de fruto menor al grupo 2, pero mayor que las pertenecientes a los grupos 1 y 4, mayor número de frutos que el grupo 2, pero menor a los otros dos grupos. En el grupo 4 las plantas fueron de porte alto a intermedio con el mayor número de frutos, pero de menor peso y más delgados que los demás grupos (Figura 2).



**Figura 2.** Representación gráfica de variables discriminantes (VD1 y VD2) de cuatro grupos de accesiones de chile de agua de acuerdo con sus características morfológicas.

López (2007) mencionó que en Chile 'de agua' hay una alta variabilidad en caracteres de fruto, así como tamaños de planta, pero que los frutos que los consumidores demandan son de color verde limón lustroso, forma cónica, consistencia dura, punta aguda, aspecto liso, tamaño de 4 a 5 cm de diámetro en la base y de 8 a 12 cm de largo. Considerando estos parámetros de calidad en fruto, las accesiones del grupo 3 son las que presentan las mejores características deseables por los consumidores. Los resultados de la caracterización morfológica generaron grupos que no estuvieron relacionados con las zonas de colecta. En otras investigaciones se han presentado resultados similares, y los autores establecen que una de las posibles causas es la polinización cruzada, ya que a pesar de que *Capsicum* sp se considera como una planta autógama, existe cierto grado de alogamia.

Otra posible explicación es que probablemente existe intercambio de semillas entre productores de la región de Valles Centrales, práctica común en semillas criollas (Aparicio-del Moral et al., 2013; Brillhante et al., 2021; Martínez-Ispizua et al., 2022).

#### 4.5.2 Caracterización molecular

Los 18 iniciadores ISSR que se utilizaron para la caracterización molecular generaron 151 bandas, 118 de las cuales fueron polimórficas, lo cual representó un 82.12 %, valor superior a lo presentado por Olatunji & Afolayan (2019) quienes con variedades de *C. annuum* y *C. frutescens* con el uso de diez iniciadores ISSR amplificaron 75 bandas, de las cuales sólo 14 fueron polimórficas (18.67 %), mientras que Tsonev et al. (2017) con 9 iniciadores generaron un polimorfismo de 24.53 %. En términos generales se puede observar que los iniciadores seleccionados fueron eficaces para detectar la variabilidad en Chile 'de agua'.

El iniciador que más amplificaciones presentó fue el LOL 8 (GT)<sub>6</sub>CC (13 bandas), con 47.97 % de amplificación a través de todas las accesiones. Los iniciadores de mayor contenido de información polimórfica (PIC) fueron PHV6, ISSR7 e ISSR3, lo que sugiere que pueden ser de gran utilidad para futuras caracterizaciones en esta especie.

La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) se encontró en el iniciador ISSR 10, lo cual sugiere que este iniciador tuvo gran poder discriminante para la separación de las accesiones evaluadas. Por otro lado, los iniciadores MELS2 y PIO4 presentaron los menores valores de capacidad discriminatoria y contenido de información polimórfica (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Descriptiva de marcadores ISSR usados para la obtención de perfiles moleculares de 55 accesiones de ‘chile de agua’.

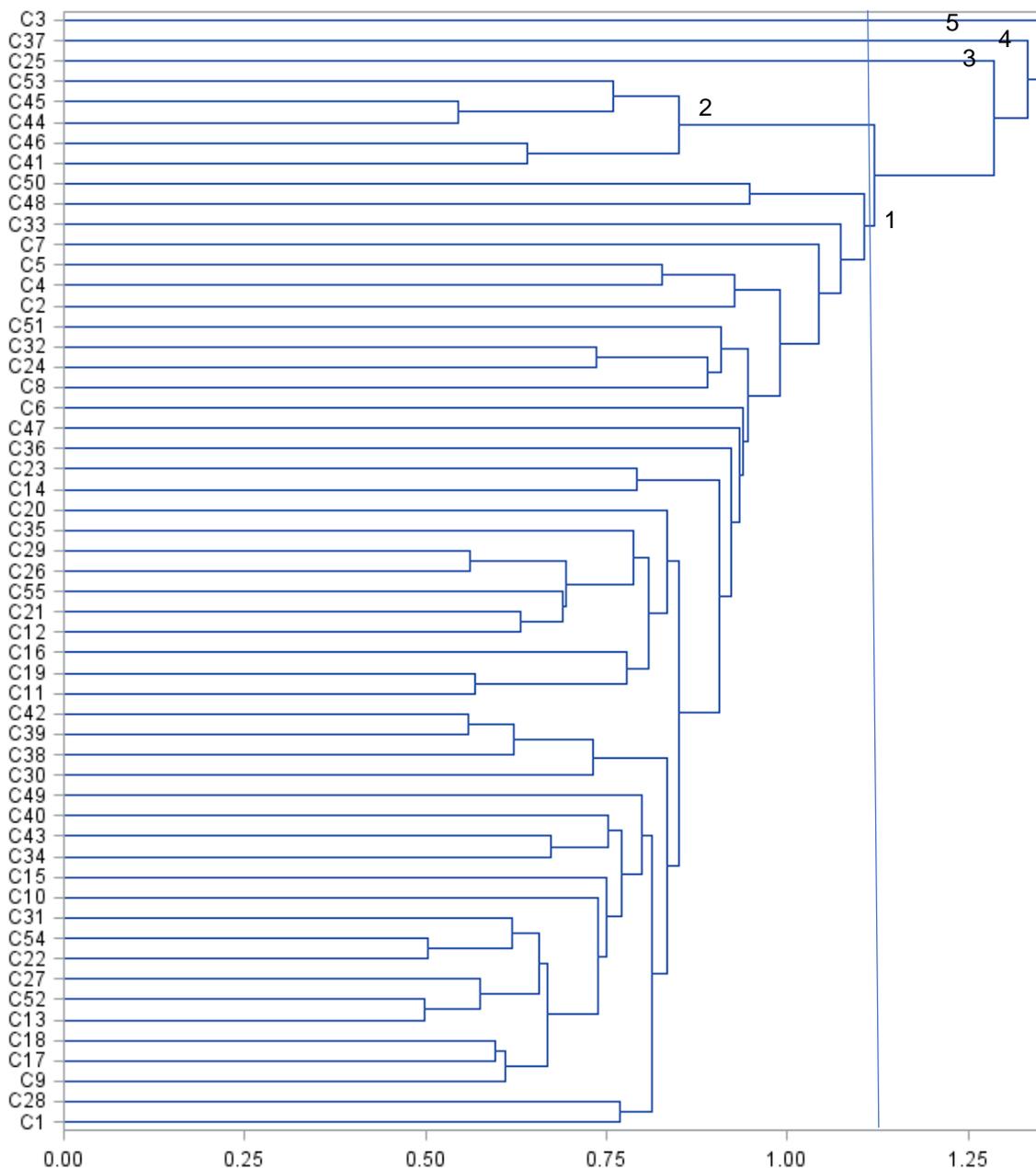
Iniciador	BP	BM	BT	PMF	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
MELS2	6	2	8	0.25	0.07	0.02	51.59	5.60E-02
A1	6	2	8	0.63	0.21	0.05	60	1.20E-05
UBC844	6	2	8	0.38	0.18	0.06	37.95	3.30E-05
PI04	8	1	9	0.11	0.07	0.03	11.11	4.40E-03
PI01	9	2	11	0.73	0.24	0.04	59.17	6.30E-07
PI03	4	3	7	0.57	0.29	0.02	81.82	5.60E-06
PI02	7	3	10	0.6	0.21	0.03	52	9.20E-05
PHV6	7	3	10	0.7	0.31	0.02	74.36	1.10E-07
LOL8	12	1	13	0.85	0.3	0.03	47.97	9.30E-11
ISSR10	2	0	2	1	0.27	0.01	33.64	6.10E-18
ISSR9	4	0	4	1	0.24	0.01	74.09	2.20E-09
ISSR8	8	2	10	0.7	0.22	0.02	47.09	3.80E-06
ISSR5	6	2	8	0.75	0.26	0.02	57.95	9.00E-07
ISSR4	5	3	8	0.5	0.23	0.02	36.14	2.60E-05
ISSR3	10	0	10	1	0.3	0.01	29.82	2.80E-16
ISSR6	7	1	8	0.88	0.25	0.02	40.23	8.90E-08
ISSR7	8	0	8	1	0.31	0.01	61.36	1.90E-12
ISSR1	9	0	9	1	0.29	0.01	25.86	5.20E-17
Total	124	27	151				48.6	9.80E-139

BP: Bandas polimórficas; BM: Bandas monomórficas; BT: Bandas totales; PMF: Proporción de loci polimórficos; PIC: Contenido de información polimórfica; E.E: Error estándar del PIC; AMP: Porcentaje de amplificación; PDICMA: Probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

El método de agrupamiento UPGMA junto al índice de disimilitud de Jaccard, originaron un dendrograma (Figura 3), donde la altura de corte 1.10 (distancia media entre conglomerados) definida mediante los estadísticos pseudo  $t^2$  y la pseudo F, permite identificar la formación de cinco grupos.

Se observa que el grupo 1 congregó a la mayoría de las accesiones (47), el grupo 2 tiene cinco y los grupos 3, 4, 5 podrían considerarse accesiones fuera de tipo. Un análisis general de este dendrograma muestra que las accesiones no se agruparon

conforme a su origen geográfico, resultados que podrían deberse a que este chile es criollo y los productores tienen la costumbre de compartir semilla entre agricultores de los diferentes distritos de los Valles Centrales de Oaxaca (Aparicio-del Moral et al.,2013).



**Figura 3.** Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares derivado del índice de disimilitud de Jaccard y método de agrupamiento UPGMA para 55 colectas de 'chile de agua'.

#### 4.5.3 Caracterización morfológica y molecular

A pesar de que los dos análisis estimaron la conformación de cuatro grupos se presentó un patrón distinto de agrupación. La combinación de los agrupamientos de la caracterización morfológica y molecular determinaron que sólo 11 accesiones presentaron el mismo patrón en ambas clasificaciones (9 %), mientras que las accesiones restantes (91 %) se ubicaron en grupos diferentes (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Subgrupos generados por la caracterización morfológica y molecular de 55 accesiones de Chile de agua.

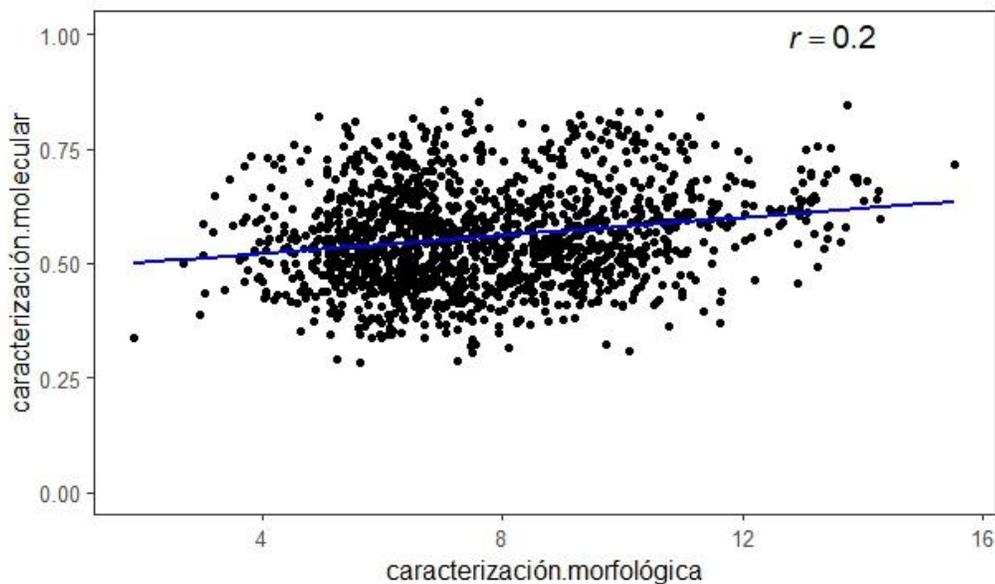
		Grupos de la caracterización morfológica			
		1	2	3	4
Grupos de la caracterización molecular	1	C35, C38, C39, C43	C4, C5, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C21, C22, C24, C26, C27	C1, C2, C6, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C23, C28, C29, C30, C31, C32, C33, C34, C47, C48, C49, C50, C51, C52, C54, C55	C36, C40, C42
	2	C41, C45		C53	C44, C46
	3		C25		
	4				C37
	5		C3		

En otros estudios donde se ha combinado la caracterización morfológica y molecular se han presentado resultados similares; Tsonev et al. (2017) en variedades de *Capsicum annuum* L. observaron dos grupos para ambos tipos de análisis con diferente patrón de agrupación, mientras que Brilhante et al. (2021) para distintas especies de *Capsicum* encontraron cinco grupos en los dos tipos de análisis, pero diferente patrón de agrupamiento.

Generalmente al conjuntar análisis morfológico y molecular en *Capsicum* se presenta este comportamiento (Carvalho et al., 2014; Hazarica & Neog, 2014;

Martínez et al., 2017). Esto podría deberse a que los caracteres morfológicos sólo representan regiones codificantes del genoma, mientras que los marcadores moleculares ISSR amplifican regiones codificantes y no codificantes (Carvalho et al. 2014; Baba et al., 2016; Martínez et al., 2017).

Los resultados de la prueba de Mantel entre las matrices de distancia (morfológica) y disimilitud (molecular) presentaron una correlación positiva baja pero significativa ( $r=0.20$ ,  $p=0.03$ ), resultados parecidos a los obtenidos por Hazarica & Neog (2014) con una correlación de 0.35, mientras que Baba et al. (2016) observaron una correlación aún más baja (0.03). Por su parte Brilhante et al. (2021) y Tsonev et al. (2017) encontraron una correlación positiva media (0.41) en ambas investigaciones. La baja correlación en este estudio sugiere la necesidad de utilizar ambos tipos de análisis para mejorar la eficacia en la caracterización de las accesiones (Figura 4).



**Figura 4.** Correlación entre las matrices de distancia del análisis molecular y morfológico.

En la caracterización morfológica el agrupamiento se debió principalmente a caracteres asociados al fruto y permitió la formación de cuatro grupos. Sin embargo, la desventaja de este tipo de caracterización es que puede ser influenciada por el ambiente. La caracterización molecular mediante ISSR permitió la identificación de

cinco grupos, con la ventaja de que los marcadores moleculares no se ven influenciados por el ambiente, sin embargo, no permite diferenciar las accesiones dentro de un grupo debido a que estos marcadores son aleatorios y dominantes.

Otra desventaja es que tampoco se puede observar características de interés agronómico o antropocéntrico de las accesiones estudiadas (Carvalho et al., 2014; Marín-Montes et al., 2016). Cuando se usan ambos tipos de caracterización se analiza de manera correcta y completa la variabilidad genética de las accesiones estudiadas. Ambos análisis deberían ser considerados como complementarios ya que se incrementa la capacidad de detectar diferencias entre accesiones y mejora la eficacia al generar grupos de conservación (Marín-Montes et al., 2016; Taitano et al., 2019).

#### **4.6 CONCLUSIONES**

Existe variabilidad genética en el chile 'de agua' y la caracterización morfológica y molecular ayudó a conocerla de manera más eficiente.

El grupo tres formado por la caracterización morfológica podría servir como base para iniciar un programa de mejoramiento genético, considerando la apariencia del fruto.

#### **4.7 LITERATURA CITADA**

- Aguirre-Mancilla, CL., Iturriaga-De la Fuente G., Ramírez-Pimentel J.G., Covarrubias-Prieto J., Chablé-Moreno F., & Raya-Pérez J.C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria México*, 5(1), 19-31.
- Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., López-López, P., Latournerie-Moreno, L., Ramírez-Meraz, M., Villalón Mendoza H., & Aguilar-Castillo J. A. (2010). *Los Chiles de México y Su Distribución*. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN.
- Aparicio-del Moral, J. O., Tornero-Campante, M. A., Sandoval-Castro, E., Villarreal-Manzo, L. A., & Rodríguez-Mendoza, M. (2013). Factores sociales y económicos del Cultivo de Chile 'de agua' (*Capsicum annuum* L.) en tres municipios de los Valles Centrales de Oaxaca. *Ra Ximhai*, 9(1), 17-24.

- Baba, V. Y., Rocha, K. R., Gomes, G. P., de Fátima Ruas, C., Ruas, P. M., Rodrigues, R., & Gonçalves, L. S. A. (2016). Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. *Genetic resources and crop evolution*, 63(8), 1371-1381. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-015-0325-4>
- Balzarini, M., & Di Rienzo, J. (2003). Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Brilhante, B. D. G., Santos, T. D. O., Santos, P. H. A. D., Kamphorst, S. H., Neto, J. D. S., Rangel, L. H., ... & Moulin, M. M. (2021). Phenotypic and molecular characterization of Brazilian *Capsicum* germplasm. *Agronomy*, 11(5), 854. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050854>
- Carvalho, S. I. C., Ragassi, C. F., Bianchetti, L. D. B., Reifschneider, F. J. B., Buso, G. S. C., & Faleiro, F. G. (2014). Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7447-7464. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.September.12.11>
- Castañón-Nájera, G., Latournerie-Moreno, L., Leshner-Gordillo, J. M., De la Cruz-Lázaro, E., & Mendoza-Elos, M. (2010). Identificación de variables para caracterizar morfológicamente colectas de chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 26(3), 225-234.
- Castellón-Martínez, E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chavez-Servia, J. L., & Vera-Guzmán, A. M. (2014). Variación fenotípica de morfotipos de chile (*Capsicum annum* L.) nativo de Oaxaca, México. *Phyton*, 83(2), 225-236.
- Hazarika R., & Neog B. (2014). Investigation of intraspecific diversity in *Capsicum chinense* using morphological and molecular markers. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 74(3), 392-395. <http://dx.doi.org/10.5958/0975-6906.2014.00860.8>
- Hotelling H. (1951). A generalized t test and measure of multivariate dispersion. Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Berkeley, California: University of California Press.
- IPGRI (1995). *Descriptors for Capsicum spp.* Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI).

- Jaccard P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist* 11(2), 37-50.
- Johnson E. D. (1998). Applied Multivariate, Methods for data Analysts. USA: Cole Publishing Company.
- López L. P. (2007, abril 7). El chile 'de agua': un chile típico de los Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Agroproduce*, 16, 8-12.
- Marín-Montes, I. M., Rodríguez-Pérez, J. E., Sahagún-Castellanos, J., Hernández-Ibáñez, L., & Velasco-García, Á. M. (2016). Variación morfológica y molecular de 55 colectas de tomate nativo de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 22(2), 117-132
- Martinez, A. L. A., Araújo, J. S. P., Ragassi, C. F., Buso, G. S. C., & Reifschneider, F. J. B. (2017). Variability among *Capsicum baccatum* accessions from Goiás, Brazil, assessed by morphological traits and molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 16(3). <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039074>
- Martínez-Ispizua, E., Calatayud, Á., Marsal, J. I., Mateos-Fernández, R., Díez, M. J., Soler, S., ... & Martínez-Cuenca, M. R. (2022). Phenotypic divergence among sweet pepper landraces assessed by agro-morphological characterization as a biodiversity source. *Agronomy*, 12(3), 632. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030632>
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López D. (2011). Uso correcto de análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415-427.
- Olatunji T. L., & Afolayan, A. J. (2019). Evaluation of genetic relationship among varieties of *Capsicum annum* L. and *Capsicum frutescens* L. in West Africa using ISSR markers. *Heliyon*, 5(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01700>
- Pérez-Castañeda, L. M., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., & Mayek-Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum spp.* *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 117-128.
- Sánchez D. C. F., & Escalante, E.R. (1989). *Hidroponía: Un sistema de producción* (3ra ed.). Universidad Autónoma Chapingo.

- SanJuan-Martínez J., Ortiz-Hernández, Y., Ortiz-Hernández, F., & López-Cruz J. (2018). Desempeño *ex situ* de dos chiles nativos de Oaxaca. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 9(21), 349-359.
- Statistical Analysis System (SAS Institute) (1983). SAS technical report A108. Cubic clustering criterion. Cary, N.C. USA: Author.
- Taitano, N., Bernau, V., Jardón-Barbolla, L., Leckie, B., Mazourek, M., Mercer, K., ... & van der Knaap, E. (2019). Genome-wide genotyping of a novel Mexican Chile pepper collection illuminates the history of landrace differentiation after *Capsicum annuum* L. domestication. *Evolutionary Applications*, 12(1), 78-92. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12651>
- Tsonev, S., Todorova, V., Groseva, S., Popova, T., & Todorovska, E. G. (2017). Evaluation of diversity in Bulgarian pepper cultivars by agronomical traits and ISSR markers. *Genetika*, 49(2), 647-662. <https://doi.org/10.2298/GENSR1702647T>
- Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marooof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., & Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(7), 2097-2100.
- Wetton, J. H., Carter, R. E., Parkin, D. T., & Walters, D. (1987). Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327(6118), 147-149.

## **CAPITULO 5. CALIDAD DE SEMILLA DE CHILE ‘DE AGUA’ (*Capsicum annuum* L.) EXTRAÍDA DE FRUTOS CON DIFERENTE GRADO DE MADUREZ**

### **5.1 RESUMEN**

El chile ‘de agua’ (*Capsicum annuum* L.) se cultiva a nivel regional en los Valles Centrales de Oaxaca y es de gran importancia económica por su producción y consumo. El chile es criollo y los productores seleccionan y producen su propia semilla; sin embargo, para tener alto rendimiento se necesita semilla de calidad por lo que es indispensable conocer la época adecuada de cosecha de frutos para garantizar semillas de alta calidad fisiológica, no obstante, en la actualidad no hay estudios al respecto en este tipo de chile. Este trabajo se hizo para determinar la mejor época de cosecha que garantice alta calidad fisiológica en la semilla. En 2021 se establecieron 50 accesiones de chile ‘de agua’ bajo invernadero en sistema hidropónico en Texcoco, México. Se cosecharon frutos a los 55, 65 y 75 días después de antesis (dda). Una vez procesada, la semilla se sometió a una prueba de germinación estándar bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones de 25 semillas. Se evaluaron el peso de mil semillas, porcentaje de germinación, porcentaje de plántulas normales, longitud de raíz y parte aérea, peso fresco y seco de plántula. Con los datos se hizo un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), así como una prueba de correlación de Pearson y un análisis de componentes principales. A los 65 dda se presentó la mejor calidad fisiológica en chile ‘de agua’.

**Palabras clave:** germinación, madurez fisiológica, chile criollo.

## SEED QUALITY OF 'DE AGUA' CHILI (*Capsicum annuum* L.) EXTRACTED FROM FRUITS WITH DIFFERENT MATURITY DEGREES

### 5.2 ABSTRACT

The 'de agua' chili (*Capsicum annuum*) produced in the Central Valleys of Oaxaca is an important crop for its production and consumption. The farmers select and produce their own chili pepper landrace seed. However, to reach high yield, it is needed high seed quality where it is essential to know the optimal time to harvest to guarantee high physiological seed quality, nevertheless, so far there is no research related with this issue. This study was carried out to determine the optimal harvest time that guarantee high physiological seed quality. In Texcoco, Mexico during 2021, 50 accessions of 'de agua' chili pepper were established under a greenhouse in a hydroponic system. Fruits were harvested at 55, 65 and 75 days after anthesis (daa). Harvested seed was subjected to a standard germination test in a completely randomized experimental design with four replications of 25 seeds. The weight of thousand seeds, percentage of germination, percentage of normal seedlings, root length and aerial part, fresh and dry weight of seedling were evaluated. An analysis of variance and Tukey's ( $P \leq 0.05$ ) comparison means test were performed on the data. A Pearson correlation test and principal component analysis were also done. At 65 DAA, the highest physiological seed quality was observed in 'de agua' chili pepper seeds.

**Key words:** germination, physiological maturity, chili landraces.

### 5.3 INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum* sp.) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia a nivel mundial, e incluye cinco especies cultivadas, dentro de las cuales *Capsicum annuum* es la más importante (García et al., 2018). En México su cultivo es de relevancia desde la perspectiva cultural, agronómica, nutricional y económica. Los chiles más cultivados son el serrano, ancho, jalapeño, pimiento y mirasol (Aguilar et al., 2010; Aguirre et al., 2017). Otros tipos de chile solo se cultivan en determinadas regiones del país, tal es el caso del chile criollo 'de agua', importante en los Valles Centrales de Oaxaca por su producción y consumo.

Para tener alto rendimiento y calidad de fruto se necesitan semillas de buena calidad genética y fisiológica, esta última se asocia con mayor éxito en el establecimiento de plantas y viabilidad de la semilla (García et al., 2018). En la producción de semillas hortícolas en el país, las empresas participan con el 90 % del mercado (Ayala et al., 2012). Sin embargo, Lesur (2006) mencionó que en el cultivo de chile el 60 % de los agricultores producen su propia semilla, esto incluye al chile 'de agua', ya que los productores dentro de su plantación comercial seleccionan la semilla que se va a utilizar para el siguiente ciclo de cultivo.

La época de cosecha idónea de semillas asegura su alta calidad ya que reduce el deterioro ocasionado por la duración prolongada de la semilla dentro del fruto o de éste en la planta y por cosecha temprana que genera semillas inmaduras (Gonçalves et al., 2018). Las plantas de chile tienen varios flujos de floración y los frutos maduran en diferentes periodos, esto ocasiona crecimiento asincrónico en la producción de semillas; aunado a que puede presentarse de manera natural bajas tasas de germinación, que genera diferente calidad de las mismas y limita obtener semillas de buena calidad (Kenanoglu et al., 2013; Ricci et al., 2013). Es necesario conocer la relación entre la maduración del fruto y la máxima calidad de semilla para determinar la mejor época de cosecha. En *Capsicum* se han realizado diferentes estudios para identificar el momento adecuado de cosecha basándose en el color del fruto o los días después de antesis (Santos et al., 2015; Moo et al., 2016; Basulto & León, 2021). No obstante, en chile 'de agua' no existe ningún estudio al respecto.

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad fisiológica de la semilla de 50 accesiones de chile 'de agua' extraída de frutos con diferente grado de madurez para determinar el momento oportuno de cosecha.

#### **5.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se realizó en el ciclo primavera verano de 2021 bajo invernadero tipo túnel de 450 m<sup>2</sup> con estructura metálica, cubierta de polietileno, ventilación lateral, y protegida con malla antiáfidos, ubicado en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' LN y 98° 53' LO; 2240 msnm); con temperatura media anual 22 °C y humedad relativa de 67 %.

Se colectaron 50 accesiones de chile 'de agua', 40 originarias de seis distritos de los Valles Centrales de Oaxaca: Ejutla (C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C27, C63, C64, C65) Ocotlán (C28, C29, C31, C32, C33, C34, C35, C60) Zimatlán (C1, C4, C8, C9, C10, C36, C40, C41, C61, C66) Tlacolula (C42, C43, C44), Centro (C62) y Etlá (C58). Adicionalmente, se estudiaron 10 accesiones de la Mixteca, específicamente de San Andrés Nuxiño (C47, C48, C49, C50, C51, C52, C53, C54, C55, C56). Las accesiones se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con una mezcla de sustratos compuesta de turba y perlita (2:1), las cuales se dispusieron en un invernadero a una temperatura de 20 °C.

Las plántulas se trasplantaron al invernadero definitivo a los 50 días después de la siembra; se utilizaron bolsas de polietileno negro de 15 litros, con tezontle rojo de textura media (partículas menores a 5 mm), a una distancia de 0.3 m entre bolsas y 0.5 entre líneas, con una densidad de 6 plantas·m<sup>-2</sup>. El riego se aplicó con solución nutritiva propuesta por Sánchez & Escalante (1989) con cintilla de 16 mm de diámetro con goteros integrados cada 30 cm. El cultivo creció de manera libre (sin podas de formación) y fue tutorado con rafia de la estructura del invernadero. Se cosecharon tres frutos por cada accesión a los 55, 65 y 75 días después de anthesis (dda). La semilla se extrajo manualmente de los frutos y se colocaron en toallas sanitas para que se secaran a temperatura ambiente; una vez secas se llevaron al

laboratorio de semillas del Departamento de Fitotecnia, donde se hizo una prueba de germinación estándar sobre papel filtro bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones de 25 semillas, acondicionadas a 28 °C en una cámara germinadora Seedburo® por 19 días (ISTA, 2005).

Las variables evaluadas fueron: peso de mil semillas (g), porcentaje de germinación y plántulas normales, considerando estas últimas como aquellas que contaban con todas sus estructuras esenciales. Se determinó el Índice de velocidad de germinación (IVG), para lo cual se hicieron conteos diarios del número de semillas germinadas y se calculó el IVG con base en la propuesta de Maguire (1962). En una muestra de 10 plántulas se midió la longitud de la parte aérea y raíz en centímetros (cm) desde el cuello del tallo hasta el ápice y la punta de la raíz, respectivamente; estas mismas plántulas fueron utilizadas para determinar en miligramos (mg) el peso fresco y seco; para tal efecto, una vez determinado el peso fresco, las plántulas se pusieron a secar a una temperatura de 75 °C durante tres días y después se procedió a evaluar el peso seco en mg.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Para determinar la correlación entre los parámetros de calidad de semilla se hizo una matriz de correlación (MC) de Pearson. De igual manera se hizo un análisis por componentes principales y biplot a partir de la MC, con el programa SPSS (SPSS, v. 25, USA).

## **5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias ( $P \leq 0.01$ ) en todos los parámetros de calidad evaluados y en las fuentes de variación consideradas, así como en su interacción, con excepción de la longitud de la parte aérea. Los coeficientes de variación de la longitud de raíz (35.7) y parte aérea (42.21) presentaron los mayores valores; al respecto, López (2007) mencionó que el chile 'de agua' por ser criollo conserva amplia variabilidad en el morfotipo de planta incluyendo la altura, y al ser accesiones de diferentes partes de los Valles Centrales mantienen mucha heterogeneidad que refleja en el coeficiente de variación en estos

dos parámetros de calidad. Con respecto a los parámetros restantes, estos estuvieron por debajo de 17.58, lo que indica una buena confiabilidad de los resultados (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Cuadrados medios del análisis de varianza para ocho parámetros de calidad de semilla de chile ‘de agua’.

FV	GL	PDS	GER	PN	IVG
DDA	2	0.31*	56711.49**	51247.24**	149.51**
A	49	3.91**	648.53**	781.66**	3.50**
DDA*A	93	0.48**	507.38**	427.35**	2.22**
E	435	0.1	68.85	41.20	0.14
TOTAL	579				
CV		4.97	13.94	12.49	17.58
MEDIA		6.49	59.51	51.38	2.13
FV	GL	LR	LA	PF	PS
DDA	2	3.20**	28.97*	467.29**	3.19**
A	49	0.17**	1.63**	43.99**	0.73**
DDA*A	93	0.08**	1.28	22.48**	0.16**
E	435	0.04	1.17	5.27	0.00
TOTAL	579				
CV		35.71	42.21	9.98	1.43
MEDIA		0.58	2.56	23.02	2.57

FV: Fuente de variación; DDA: días después de antesis; A: accesión; CV: coeficiente de variación; GL: grados de libertad; PDS: peso de mil semillas; GER: porcentaje de germinación; PN: porcentaje de plántulas normales; IVG: índice de velocidad de germinación; LR: longitud de raíz LA: longitud parte aérea; PF: peso fresco de plántula; PS: peso seco de plántula; \*: significativo con  $p \leq 0.05$ ; \*\*: altamente significativo con  $p \leq 0.01$ .

El peso de mil semillas fue mayor a los 55 y 65 dda con 6.49 y 6.53 g (Cuadro 2), situación similar a la observada en chile pimiento por Ruiz & Parera (2017), ya que a la semana 8 (56 dda) y 9 (63 dda) después de antesis obtuvieron el mayor peso seco de semilla.

A su vez Pinheiro et al. (2020) observaron en Chile 'cumari' que el peso de 100 semillas a los 65 dda fue de 2.25 g; almacenando los frutos por 5 días la semilla aumentó a 2.5 g y por diez días (75 dda) disminuyó a 2.05 g. Por otra parte, en este experimento el porcentaje de germinación (68.95 y 68.54 %) y plántulas normales (60.25 y 60.13 %) alcanzaron los mayores resultados a los 65 y 75 dda, similarmente a lo que reportaron Sanjuan et al. (2020) en Chile de agua (51 % y 16 %) y Chile pimiento donde Ruiz & Parera (2017) encontraron que la mayor germinación fue a partir de los 63 dda (76.5 %), mientras que Vidigal et al. (2011) a partir de los 55 dda observaron la mayor germinación.

En las variables restantes de vigor, a los 65 dda se presentaron los mayores resultados ( $P \leq 0.05$ ), con un índice de velocidad de germinación de 2.85, longitud de raíz y parte aérea de 0.70 y 2.92 cm, respectivamente (Cuadro 6). Estos resultados fueron más bajos que los reportados para 'Chile de agua' por Sanjuan et al. (2020), donde el IVG reportado fue de 9.0 mientras que en la longitud de raíz y parte aérea fue de 1.94 y 3.95 cm.

A los 65 dda el peso fresco y seco de plántula fueron de 24.76 y 2.69 mg, respectivamente, esto como producto del peso seco de semilla obtenido en la misma época, donde se obtuvo la máxima acumulación de materia seca en semilla. En este contexto es de suponer que a los 65 dda se logró la mayor calidad fisiológica de semilla, misma que comienza a disminuir a los 75 dda, fenómeno biológicamente lógico debido a que una vez que se alcanza la maduración de la semilla y consecuentemente la máxima calidad de semilla, ésta inicia con un proceso natural de deterioro (Ricci et al., 2013; Pinheiro et al., 2020).

No obstante, cabe mencionar que la máxima calidad puede variar dependiendo del genotipo, por ejemplo, Moo et al. (2016) encontraron en Chile habanero la madurez fisiológica de la semilla a los 45 y 55 dda, mientras que Ayala et al. (2014) observaron en Chile ancho y guajillo que se necesitan de 90 a 110 dda.

En otros casos basados en la maduración del chile, frutos maduros coinciden con la máxima calidad de semilla y en frutos sobremaduros o con días de almacenamiento, la calidad comienza a disminuir (Kenanoglu et al., 2013; García et al., 2018; Basulto & León, 2021), lo que implica que para cada especie e inclusive para cada genotipo es necesario determinar su propia época óptima de cosecha.

**Cuadro 6.** Comparación de medias de ocho parámetros de calidad de semilla de frutos de chile ‘de agua’ cosechados a diferentes días después de antesis.

DDA	PDS (g)	GER (%)	PN (%)	IVG
55	6.49 ab <sup>t</sup>	38.98 b	31.81 b	1.15 c
65	6.53 a	68.95 a	60.25 a	2.85 a
75	6.45 b	68.54 a	60.13 a	2.29 b
DMSH	0.07	1.99	1.53	0.09
DDA	LR (cm)	LA (cm)	PF (mg)	PS (mg)
55	0.47 c	2.23 c	22.37 b	2.41 c
65	0.70 a	2.92 a	24.72 a	2.69 a
75	0.56 b	2.48 b	21.86 b	2.60 b
DMSH	0.04	0.23	0.49	0.01

<sup>t</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ); DDA: días después de antesis; PDS: peso de mil semillas; GER: porcentaje de germinación; PN: porcentaje de plántulas normales; IVG: índice de velocidad de germinación; LR: longitud de raíz LA: longitud parte aérea; PF: peso fresco de plántula; PS: peso seco de plántula; DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

Con excepción del peso fresco de plántula y peso de mil semillas, en los demás parámetros los menores valores se obtuvieron a los 55 dda, a pesar de que los frutos estaban completamente maduros pues tenían una coloración completamente roja, esto podría deberse a que la semilla puede seguir acumulando reservas después de la maduración del fruto, lo que a su vez explicaría que los porcentajes de germinación no alcanzaron más del 70 %, y además es una buena razón para argumentar el motivo por el cual los productores cosechan los frutos de chile ‘de agua’ cuando están maduros y extraen la semilla después de una semana a un mes (Velasco, 2007).

En estudios con diversos chiles se ha visto que la calidad fisiológica de la semilla mejora si se cosechan los frutos y se almacenan por varios días para extraer posteriormente la semilla (Ricci et al., 2013; Caixeta et al., 2014; Gonçalves et al., 2018; Martínez et al., 2019; de Medeiros et al., 2020; Garrido & Laurentin, 2021), de tal modo que si se cortan los frutos a los 55 dda y se almacenan sin extraer la semilla durante diez días, la semilla pudiera mejorar su calidad fisiológica y tener resultados parecidos a los 65 dda.

Entre algunas accesiones los parámetros no presentaron diferencia estadística entre ellas, por lo que la presente discusión se centra en aquellas con los valores más altos y bajos en cada parámetro en donde si existe diferencia ( $P \leq 0.05$ ). Sólo en el peso de mil semillas y seco de plántula se observó una tendencia con respecto al lugar de origen de las accesiones en donde los valores más altos se observaron en la mayoría de la Mixteca, en los demás parámetros, accesiones de diferentes lugares presentaron tanto valores altos como bajos

El mayor peso de mil semillas lo obtuvo la accesión de la Mixteca C55 con 8.50 g, mientras que, entre las accesiones de menor peso, Etlá C58 presentó 5.57 g, en ambos casos con resultados superiores a lo reportado por Carrillo et al. (2009) en 14 accesiones de chile de agua quienes encontraron peso de mil semillas entre 4.84 y 6.24 g.

En el porcentaje de germinación la accesión de Ejutla C63 (74.62 %) destaca entre las 21 accesiones con el mayor porcentaje, mientras que entre las 12 con menor valor, Zimatlán C1 (41.64 %) representa la más baja. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos por Carrillo et al. (2009) ya que cuantificaron germinación de 70 a 92.7 %. El porcentaje de plántulas normales marcó la misma tendencia, con el valor más alto de Ejutla C63 (66.57 %) y el menor de Zimatlán C1 (30.6 %), resultados más altos a los reportados (16 %) por Sanjuan et al. (2020) en la misma variedad (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Comparación de medias de peso de semilla (PDS), porcentaje de germinación (GER) y plántulas normales (PN) en semillas de 50 accesiones de chile ‘de agua’.

Variable	Accesiones	DMSH
PDS (mg)	C55; C54, C52, C51, C48, C47, C49, C8, C56, C50, C33, C13, C53, C64, C29, C36, C19, C44, C34, C9, C18, C10, C12, C1, C28, C4, C60, C63, C65, C20, C61, C35, C62, C15, C11; C22, C66, C23, C17, C32, C21, C40, C31, C43, C14, C16, C41, C42, C27, C58 8.50a <sup>t</sup> ; 7.87b - 6.20ir; 6.2js - 5.7s	0.53
GER (%)	C63, C23, C50, C53, C29, C47, C52, C32, C65, C58, C28, C31, C36, C41, C21, C15, C40, C62, C51, C12, C20, C11, C17, C8; C9, C64, C22, C27, C34, C55, C13, C54, C61, C44, C48, C35, C66; C18, C16, C4, C10, C42, C60, C56, C14, C43, C19, C33, C49, C1 74.62a - 60.94aj; 60.21bk - 56.74cl; 54.50dm - 41.64m	13.96
PN (%)	66.57a - 56.17aj; 54.70bk - 30.60t	10.80

<sup>t</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P≤0.05); DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

En el índice de velocidad de germinación las accesiones de Ejutla C23 y Ocotlán C29 presentaron el valor más alto, ambas con 3.57 y entre el grupo de 13 accesiones con el menor valor, Mixteca C49 registró el valor más bajo (1.07). Estos resultados son menores comparados con otros chiles cultivados como pimiento (7.35 a 19), chile ancho (5.6) chile guajillo (6.1), pero mayores a chiles semidomesticados como chiltepín que tiene IVG menor a 1 (Ruiz & Parera, 2017;

Alcalá et al., 2019; Martínez et al., 2019 y Sanjuan et al.,2020). Poco más del 50 % de las muestras tuvieron estadísticamente la mayor longitud de raíz, sin embargo, entre ellas la accesión de Ocotlán C28 (0.81 cm) tuvo numéricamente el mayor valor, y entre el grupo de las más cortas, la accesión de la Mixteca C55 (0.38 cm) presentó el resultado más bajo. En la longitud de la parte aérea dos accesiones de Ocotlán (C32 y C34) presentaron el mayor (4.41cm) y menor valor (2.1 cm), respectivamente (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Comparación de medias del índice de velocidad de germinación (IVG), longitud de raíz (LR) y parte aérea (LA) en semillas de 50 accesiones de chile ‘de agua’.

Variable	Accesiones	DMSH
	C23, C29; C9, C28, C47, C58, C10, C21, C13, C53, C22, C36, C31, C8, C15, C41, C61, C17, C27, C32, C63, C44, C62, C12, C60, C11, C20, C50, C48, C65, C52, C40, C64, C4, C66, C18, C54, C34; C42, C51, C43, C35, C55, C14, C16, C33, C19, C56, C1, C49	
IVG	3.57a <sup>†</sup> ; 2.91b - 1.77js; 1.69kt – 1.07t	0.63
	C28, C32, C20, C63, C41, C31, C61, C64, C27, C65, C8, C23, C4, C36, C48, C62, C33, C1, C34, C19, C14, C21, C22, C60, C29, C9, C35, C43, C58, C12, C40, C53, C16, C66, C13, C47, C51; C52, C56, C15, C18, C11, C17, C50, C44, C54, C10, C49, C42, C55	
LR (cm)	0.81a - 0.50ag; 0.48bg - 0.38g	0.31
	C32, C47, C41, C12, C65, C33, C9; C53, C51, C54, C28, C8, C50, C56, C62, C55, C1, C64, C27, C63, C52, C36, C44, C31, C20, C22, C10, C43, C61, C23, C29, C48, C60, C49, C58, C14, C42, C18, C35, C66, C16, C17, C13, C11, C15, C21, C4, C19, C40, C34	
LA (cm)	4.41a-2.78ab; 2.77- 2.10b	1.63

<sup>†</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P≤0.05); DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

Los resultados de longitud de raíz fueron superiores a lo observado por Carrillo et al. (2009) ya que observaron longitudes de 0.40 a 0.53 cm. Por otro lado, encontraron mayor longitud de la parte aérea (5.9 a 7.76 cm) que en este estudio.

Entre 25 accesiones con estadísticamente el mayor resultado del peso fresco de plántula, la muestra de Ejutla C64 presentó el mayor valor (26.31 mg) mientras que la accesión C35 tuvo el menor peso con 20.31 mg; por último, en peso seco de plántula la accesión Mixteca C55 pesó más con 3.26 mg y las de menor peso fueron las accesiones de Ejutla C14, C15 y C27 (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Comparación de medias de peso fresco (PF) y seco (PS) de plántulas de 50 accesiones de chile ‘de agua’.

Variable	Accesiones	DMSH
	C64, C48, C56, C47, C8, C9, C65, C13, C51, C66, C12, C20, C41, C32, C36, C55, C28, C10, C50, C63, C53, C54, C19, C52, C29, C62, C33; C31, C1, C49, C4, C15, C61, C60, C17, C22, C43, C18, C11, C34, C44, C14, C40, C35, C23, C58, C16, C21, C42, C27	
PF (mg)	26.31a <sup>t</sup> -22.91aj; 22.68bk - 18.93l	3.41
	C55; C52, C48, C56, C54, C51; C64, C47, C8, C65, C12, C50, C9, C49, C19, C20, C32, C28, C4, C53, C10, C29, C63, C42, C36, C61, C60, C62, C31, C66, C23, C22, C18, C41, C35, C58, C16, C21, C13, C17, C44, C34, C1, C40, C43, C33, C11; C15, C14, C27	
PS (mg)	3.26a; 3.14b-3.01c; 2.88d -2.28w; 2.19 - 2.17x	0.06

<sup>t</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P≤0.05); DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

Cabe destacar que los parámetros de calidad en las accesiones se ven afectados por el factor días después de antesis ya que como se mencionó a los 55 y 75 dda hubo resultados más bajos para la mayoría de estos parámetros.

Por consiguiente, si sólo se tomaran en cuenta los obtenidos a los 65 dda mejorarían los valores presentados con respecto a otros estudios tanto en chile de agua como en otras variedades o especies de *Capsicum*.

En la matriz de correlaciones (MC) el índice de velocidad de germinación, porcentaje de germinación y plántulas normales estuvieron correlacionadas positivamente ( $P \leq 0.05$ ) entre sí, mientras que el peso de mil semillas lo fue con el peso seco de plántula (0.81), que a su vez presentó una correlación de 0.65 con peso fresco (Cuadro 10). Estos resultados difieren a lo encontrado en otros estudios tanto de chile 'de agua' como en otras especies de *Capsicum* ya que se ha observado que el peso de semilla presenta alta correlación positiva con todos los parámetros (Carrillo et al., 2009; Ayala et al., 2014). En este estudio, accesiones con semillas de mayor peso no necesariamente mostraron mayor porcentaje de germinación, plántulas normales, IVG y plántulas con tallos y raíces largos, lo que puede deberse a la alta variabilidad entre genotipos en el chile de agua (Aguirre et al., 2017).

**Cuadro 10.** Matriz de coeficiente de correlación Pearson entre parámetros de calidad de semilla en 50 accesiones de chile 'de agua' cosechadas a diferentes días después de antesis.

	PDS	GER	PN	IVG	LR	LA	PF	PS
PDS	1	-0.01	-0.15	-0.20	-0.37	0.13	0.54	0.81*
GER		1	0.94*	0.69*	0.25	0.30	0.14	0.14
PN			1	0.75*	0.41	0.28	0.09	0.06
IVG				1	0.24	0.10	0.03	-0.13
LR					1	0.31	0.12	-0.14
LA						1	0.38	0.30
PF							1	0.65*
PS								1

PDS: peso de mil semillas; GER: porcentaje de germinación; PN: porcentaje de plántulas normales; IVG: índice de velocidad de germinación; LR: longitud de raíz LA: longitud parte aérea; PF: peso fresco de plántula; PS: peso seco de plántula. \*: significativo ( $p \leq 0.05$ ).

El análisis de componentes principales (ACP) indicó que con tres componentes principales (CP) se explica el 82.25 % de la variación total (Cuadro 5). Una vez

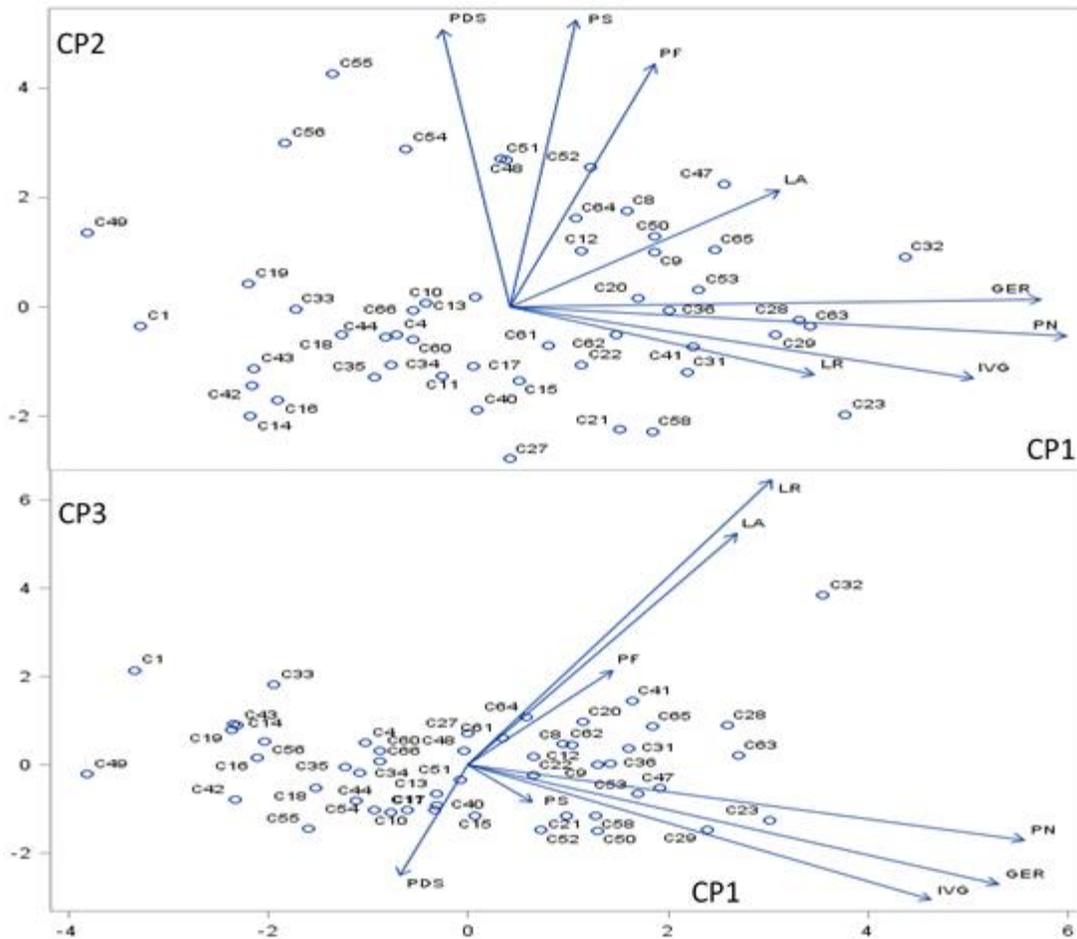
obtenidos los CP se procedió a rotarlos mediante el método Varimax, lo que permitió ubicar de manera más adecuada, los parámetros de calidad dentro de los CP, sin cambiar sus valores propios o la varianza que explica cada uno de ellos (De la Garza et al., 2013). El CP1 representa 32.43 % de la variación y de manera positiva al porcentaje de germinación, plántulas normales e índice de velocidad de germinación, mientras que el CP2 (31.42 %) involucra al peso de mil semillas, peso fresco y seco de plántula; por último, el CP3 (18.41 %) está conformado positivamente con longitud de raíz y parte área de plántula (Cuadro 11). El ACP rotado permite reducir parámetros de calidad de semilla e interpretar de mejor manera las correlaciones entre estos que la MC.

**Cuadro 11.** Vectores y valores propios de tres componentes principales en los parámetros de calidad evaluados en semilla de 50 accesiones de chile ‘de agua’.

Variables	CP1	CP2	CP3
PDS (peso de mil semillas)	-0.10	<b>0.91</b>	-0.23
GER (porcentaje de germinación)	<b>0.93</b>	0.13	0.13
PN (porcentaje de plántulas normales)	<b>0.94</b>	-0.00	0.25
IVG (índice de velocidad de germinación)	<b>0.88</b>	-0.13	0.04
LR (longitud de raíz)	0.20	-0.25	<b>0.83</b>
LA (longitud parte aérea)	0.13	0.35	<b>0.72</b>
PF (peso fresco de plántula)	0.03	<b>0.77</b>	0.36
PS (peso seco de plántula)	0.03	<b>0.93</b>	0.02
Valor propio	2.59	2.51	1.47
Proporción de la varianza	32.43	31.42	18.41
Varianza acumulada	32.43	63.85	82.25

Con esta propuesta si se conoce el porcentaje de germinación, se podría saber cómo será el índice de velocidad de germinación y el porcentaje de plántulas normales, y con el peso de semilla se puede inferir el peso fresco y seco de la plántula; por último, plántulas altas, tendrán una raíz larga.

El biplot del ACP además de mostrar las tendencias de los parámetros de calidad de semilla, permite visualizar de manera gráfica la distribución de accesiones con respecto a estos parámetros dentro de los componentes principales (Figura 5).



**Figura 5.** Biplot del ACP para los tres componentes principales de parámetros de calidad de semilla en 50 accesiones de Chile ‘de agua’.

Las accesiones que presentan valores más altos en el CP1 tienen mayor porcentaje de germinación, plántulas normales e IVG y viceversa. Accesiones con valores altos en el CP2 tienen mayor peso de semilla, peso fresco y seco de plántula, por otro lado, si tienen valores bajos tienen poco peso de semilla, peso fresco y seco de plántula. En el CP3 las accesiones con valores altos presentan mayor longitud de raíz y parte aérea, si tienen valores bajos tienen raíz corta y la parte aérea es de porte bajo.

Resultados similares fueron encontrados por Dutta et al. (2019) en *Capsicum frutescens* ya que, al hacer un ACP para algunos parámetros de calidad de semilla, encontraron que el primer CP representa al porcentaje de germinación y vigor de semilla, mientras que el segundo al peso fresco de raíz y el tercero a al peso fresco de la parte aérea.

## 5.6 CONCLUSIONES

Los frutos de chile 'de agua' cosechados a los 65 días después de antesis presentan la mejor calidad fisiológica de semilla.

La calidad de la semilla en chile 'de agua' cambia de acuerdo con el genotipo, accesiones con mayor peso de mil semillas no necesariamente presentan la mejor calidad fisiológica.

## 5.7 LITERATURA CITADA

- Aguilar, R. V. H., Corona T. T., López, L. P., Latournerie, M. L., Ramírez, M, M., Villalón, M. H., & Aguilar, C. J. A. (2010). *Los chiles de México y su distribución*. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN.
- Aguirre, M. C. L., Iturriaga, D. G., Ramírez, P. J.G., Covarrubias, P. J., Chablé, M. F., & Raya, P. J.C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 19-31.
- Alcalá, R. J. S. G. J., López, B. A., Vázquez, B. M. E., Sánchez, A. D., Rodríguez, H. S. A., Pérez, R. M. Á., & Ramírez, G. F. (2019). Seed physiological potential of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* genotypes and their answers to pre-germination treatments. *Agronomy*, 9(6), 325. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060325>
- Ayala, G. A. V., Schwentesius, R. R., & Carrera, C. B. (2012). Hortalizas en México: competitividad frente a EE. UU. y oportunidades de desarrollo. *Revista de Globalización, Competitividad y Gobernabilidad* 6(3), 70-88.
- Ayala, V. M. J., Ayala, G. O. J., Aguilar, R. V. H., & Corona, T. T. (2014). Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annuum* L. durante su desarrollo en el fruto. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(1), 79-87.

- Basulto, F. S., & León, M. J. Z. (2021). Estados de maduración de frutos de chile Xcat ik (*Capsicum annum* L) y su relación con el periodo de almacenamiento en la germinación de las semillas. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4(3), 4674-4683. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n3-145>
- Caixeta, F.; von Pinho, V. R. É.; Guimarães, R. M.; Pereira, P. H. A. R., & Catão, H. C. R. M. (2014). Physiological and biochemical alterations during germination and storage of habanero pepper seeds. *African Journal of Agricultural Research*, 9(6), 627-635. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7133>
- Carrillo, E. P., Mejía, C. J. A., Carballo, C. A., García, S. G., Aguilar, R. V. H., & Corona, T. T. (2009). Calidad de semilla en colectas de chile de agua (*Capsicum annum* L.) de los Valles centrales de Oaxaca, México. *Agricultura Técnica en México*, 35(3), 257-266.
- De la Garza, G. J., Morales, S. B. N., & González, C. B. A. (2013). *Análisis estadístico multivariante. Un enfoque teórico y práctico*. McGraw-Hill Interamericana.
- de Medeiros, A. D., Zavala, L. M. J., da Silva, L. J., Oliveira, A. M. S., & Dias, D. C. F. D. S. (2020). Relationship between internal morphology and physiological quality of pepper seeds during fruit maturation and storage. *Agronomy Journal*, 112(1), 25-35. <https://doi.org/10.1002/agj2.20071>
- Dutta, S. K., Layek, J., Akoijam, R. S., Boopathi, T., Saha, S., Singh, S. B., & Prakash, N. (2019). Seaweed extract as natural priming agent for augmenting seed quality traits and yield in *Capsicum frutescens* L. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3803-3813. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01871-0>
- García, R. R. F., Castañeda, G. S. L., & Valdéz, H. E. F. (2018). Quality of rocoto pepper (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.) seeds in relation to extraction timing. *Acta Agronómica*, 67(2), 246-251. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.59057>
- Garrido, L., & Laurentin, H. (2021). Germination in a venezuelan type of *Capsicum chinense* jacq.: influence of fruit ripening and seed extraction from the fruit. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(1), 45-53. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)45-53](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)45-53)
- Gonçalves, L. S., Gomes, G. P., Damasceno, J. C. V., Queiroz, R. A. D., Takahashi, L. S., da Costa, D. S., & Nunes, M. P. (2018). Seed physiological potential of “dedo-de-moça” pepper in relation to maturation stages and rest periods of

the fruits. *Horticultura Brasileira*, 36(4), 486-491.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-053620180410>

ISTA (2005). International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, 4, 3-177.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2), 176-177.

Kenanoglu, B. B., Demir, I. & Jalink, H. (2013). Chlorophyll fluorescence sorting method to improve quality of *Capsicum* pepper seed lots produced from different maturity fruits. *HortScience*, 48(8), 965-968.

Lesur, L. (2006). *Una guía paso a paso: Manual del cultivo del chile*. Editorial Trillas.

López, L. P. (2007, abril 7). El chile 'de agua': un chile típico de los Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Agroproduce*, 16, 8-12.

Martínez, M. M., Ayala, G. Ó. J., Aguilar, R. V. H., Conde, M. V., & Corona, T. T. (2019). Seed quality and LEA-protein expression in relation to fruit maturation and post-harvest storage of two chilies types. *The Horticulture Journal*, 88(2), 245-252. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-044>

Moo, M. A. J., Latournerie, M. L., Pinzón, L. L. L., Ayala, G. O. J., & Tzec, M. Y. A. (2016). Efecto de la madurez y secado de semilla de *Capsicum chinense* Jacq. en la germinación y calidad fisiológica de plántula. *Agroproductividad*, 9(1), 63-67.

Pinheiro, D. T.; Oliveira, R. M. D.; Silveira, A. D. S.; León, M. J. Z.; Brum, L. B. T. L., & Dias, D. C. F. D. S. (2020). Antioxidant enzyme activity and physiological potential of *Capsicum baccatum* var. *baccatum* seeds as a function of post-harvest storage of fruit. *Journal of Seed Science*, 42, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v42235315>

Ricci, N., Pacheco, A. C., Conde, A. S., & Custódio, C. C. (2013). Qualidade de sementes de pimenta jalapenho em função da maturação e tempo de permanência nos frutos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(2), 123-129.

Ruiz, M. B., & Parera, C. A. (2017). Effect of harvesting time on seed quality of two bell pepper cultivars (*Capsicum annuum*). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 49(2), 67-77.

- Sánchez, D. C. F. y Escalante, E.R. (1989). *Hidroponía: Un sistema de producción*. (3ra ed.). Universidad Autónoma Chapingo.
- Sanjuan, M. J., Ortiz, H. Y. D., Aquino, B. T., & Cruz, I. S. (2020). Seed and seedling quality of three chilis (*Capsicum annuum* L.) native to Oaxaca, Mexico. *Ciência Rural*, 50(9), 7. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190921>
- Santos, H. O., Von Pinho, E. V. R., Von Pinho, I. V., Dutra, S. M. F., Andrade, T., & Guimarães, R. M. (2015). Physiological quality and gene expression during the development of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacquin) seeds. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 5085-5098. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.12.11>
- SAS Institute 2009. SAS/STAT® 9.2. Users's Guide Release. Cary, NY: Institute Inc., USA.
- Velasco, V. V. A. (2007, abril 7). Selección de frutos de chile de agua. *Revista Agroproduce*.16, 18-19.
- Vidigal, D. D. S., Cunha, F. D., Dos Santos, D. L. A., & Luiz, F. F. 2011. Changes in seed quality during fruit maturation of sweet pepper. *Sci. Agric.* 68 (5), 535-539.