



# Universidad Autónoma Chapingo

## DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Instituto de Horticultura

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y APROXIMACIÓN ETNOBOTÁNICA DEL CHILE CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) DE LA VERTIENTE ORIENTAL DE MÉXICO

#### TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

#### MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta

**Biol. REBECA HERNÁNDEZ PEÑA**

Bajo la supervisión de:

**Dr. JUAN MARTÍNEZ SOLÍS**

Chapingo, Estado de México, mayo 2019



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



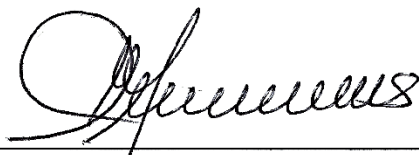
Instituto de Horticultura

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y APROXIMACIÓN ETNOBOTÁNICA DEL  
CHILE CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) DE LA  
VERTIENTE ORIENTAL DE MÉXICO**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

DIRECTOR:



---

Dr. Juan Martínez Solís

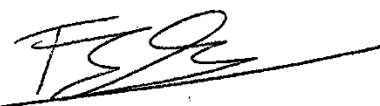
ASESOR:



---

Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

ASESOR:



---

Dr. Fernando González Andrés

## CONTENIDO

|                                                              |               |
|--------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>LISTA DE CUADROS .....</b>                                | <b>vi</b>     |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                | <b>vii</b>    |
| <b>LISTA DE APÉNDICES .....</b>                              | <b>viii</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                                 | <b>ix</b>     |
| <b>DATOS BIOGRÁFICOS.....</b>                                | <b>x</b>      |
| <b>RESUMEN GENERAL .....</b>                                 | <b>xi</b>     |
| <b>GENERAL SUMMARY .....</b>                                 | <b>xii</b>    |
| <br><b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>            | <br><b>1</b>  |
| OBJETIVOS.....                                               | 3             |
| HIPÓTESIS.....                                               | 3             |
| <br><b>CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>         | <br><b>4</b>  |
| <b>2.1 DIVERSIDAD GENÉTICA.....</b>                          | <b>4</b>      |
| <b>2.2 CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS .....</b>      | <b>6</b>      |
| <b>2.3 CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA.....</b>               | <b>7</b>      |
| 2.3.1 Caracterización morfológica.....                       | 8             |
| 2.3.2 Caracterización molecular.....                         | 9             |
| 2.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....      | 10            |
| 2.3.2.2 ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats).....          | 14            |
| <b>2.4 GENERALIDADES DEL CHILE CHILTEPÍN EN MÉXICO .....</b> | <b>17</b>     |
| 2.4.1 Taxonomía .....                                        | 17            |
| 2.4.2 Origen y distribución.....                             | 18            |
| 2.4.3 Aspectos botánicos .....                               | 19            |
| 2.4.3.1 Citogenética.....                                    | 21            |
| 2.4.4 Importancia económica .....                            | 21            |
| 2.4.5 Problemática comercial .....                           | 23            |
| 2.4.6 Aspectos etnobotánicos .....                           | 24            |
| 2.4.7 Estudios previos.....                                  | 25            |
| <br><b>LITERATURA CITADA.....</b>                            | <br><b>27</b> |

**CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y APROXIMACIÓN  
ETNOBOTÁNICA DEL CHILE CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*)  
DE LA VERTIENTE ORIENTAL DE MÉXICO .....35**

**RESUMEN ..... 35**

**ABSTRACT ..... 36**

**INTRODUCCIÓN ..... 37**

**MATERIALES Y MÉTODOS ..... 39**

**1. COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL ..... 39**

**2. TRATAMIENTO PRE-GERMINATIVO ..... 39**

**3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR ..... 40**

3.1 Extracción y purificación de ADN mediante el método CTAB. .... 40

3.2 Cuantificación y cualificación de ADN. .... 41

3.3 Obtención de patrones tipo ISSR. .... 42

**4. RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN ETNOBOTÁNICA ..... 45**

**5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... 45**

Caracterización molecular..... 45

5.1 Descriptiva de marcadores..... 45

5.2 Matriz de similitud. .... 46

5.3 Análisis de agrupamiento. .... 46

5.4 Índice de diversidad genética de Shannon-Weaver y análisis de varianza molecular. .... 46

5.5 Análisis de coordenadas principales (ACOORP)..... 47

5.6 Análisis espacial de la variabilidad genética..... 47

Aspectos etnobotánicos. .... 48

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....51**

**1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR ..... 51**

1.1 Descriptiva de marcadores..... 54

1.2 Análisis de agrupamiento. .... 55

1.3 Índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) y análisis de varianza molecular ..... 57

1.4 Análisis de coordenadas principales. .... 59

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 1.5 Prueba de Mantel.....             | 61        |
| <b>2. ANÁLISIS ETNOBOTÁNICO .....</b> | <b>63</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>             | <b>76</b> |
| <b>LITERATURA CITADA .....</b>        | <b>77</b> |
| <b>APÉNDICES .....</b>                | <b>80</b> |

## LISTA DE CUADROS

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Clasificación de los sistemas de marcadores moleculares basados en amplificación por PCR.....                                                                                                   | 14 |
| <b>Cuadro 2.</b> Precio mínimo y máximo en pesos del chile Chiltepín por región geográfica en México. ....                                                                                                       | 23 |
| <b>Cuadro 3.</b> Intervalo de valores de la relación 260/280 ( $\lambda$ ) indicador de la pureza del ADN aislado.....                                                                                           | 41 |
| <b>Cuadro 4.</b> Iniciadores seleccionados, secuencia y temperatura de alineamiento para la obtención de los perfiles ISSR. ....                                                                                 | 43 |
| <b>Cuadro 5.</b> Componentes y sus concentraciones en la mezcla de reacción para PCR con un volumen final de 25 $\mu$ L. ....                                                                                    | 44 |
| <b>Cuadro 6.</b> Condiciones de temperatura, duración y número de ciclos de amplificación de la PCR para la obtención de patrones de tipo ISSR.....                                                              | 44 |
| <b>Cuadro 7.</b> Categorización de las variables sociales de conocimiento local, usos y manejo del chile Chiltepín obtenidas a partir de 75 encuestas. ....                                                      | 48 |
| <b>Cuadro 8.</b> Descriptiva de 10 marcadores ISSR usados para la obtención de perfiles moleculares de 70 UBCs de chile Chiltepín. ....                                                                          | 54 |
| <b>Cuadro 9.</b> Índice de Shannon-Weaver, número y porcentaje de loci polimórficos para tres poblaciones determinadas a priori de acuerdo a su localización geográfica. ....                                    | 57 |
| <b>Cuadro 10.</b> Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para las 70 UBCs de chile Chiltepín .....                                                                                                            | 58 |
| <b>Cuadro 11.</b> Análisis de coordenadas principales y partición de varianza molecular de 70 UBCs de chile Chiltepín. ....                                                                                      | 59 |
| <b>Cuadro 12.</b> Variables sociales y agronómicas de conocimiento, usos y manejo del chile Chiltepín en la vertiente oriental de México.....                                                                    | 66 |
| <b>Cuadro 13.</b> Medidas de discriminación de las variables etnobotánicas para las primeras dos dimensiones empleadas en la aplicación de 75 encuestas de conocimiento, manejo y usos del chile Chiltepín. .... | 71 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los tres pasos principales de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Singh y Singh, 2015).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 13 |
| <b>Figura 2.</b> Iniciadores ISSR anclados en 5' y 3' utilizados para amplificar regiones genómicas flanqueadas por dos elementos microsatélite con orientación inversa (Zietkiewics <i>et al.</i> ,1994).....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Mapa de la distribución del chile Chiltepín ( <i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i> (Dunal) Heiser & Pickersgill) en México (Montes, 2010). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 18 |
| <b>Figura 4.</b> Morfología del chile Chiltepín. A: Hábito arbustivo de la planta; B: Flores solitarias axilares; C, D y E: Variedad de frutos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 19 |
| <b>Figura 5.</b> Mapa de sitios geográficos de colecta de frutos y semillas de chile Chiltepín de la vertiente oriental mexicana.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 39 |
| <b>Figura 6.</b> Patrones de bandeo generados en la prueba de 28 iniciadores ISSR (Sigma®). Carriles: 1→ ISSR 1; 2→ ISSR 2; 3 → ISSR 5; 4→ ISSR 7; 5→ PI 01; 6→ PHV 6; 7→ PHV 7; 8→ ISSR 3; 9→ ISSR 4; 10→ ISSR 6; 11→ PI 04; 12→ LOL 8; 13→ ISSR 8; 14→ LOL 2; 15→ PI 02; 16→ PI 03; 17→ MESL 2; 18→ MESL 3; 19→ ISSR 9; 20→ ISSR 10; 21→ LOL 7; 22→ MESL 1; 23→ Echt 5; 24→ 17899 A; 25→ 17898 B; 26→ LOL 9; 27→ LOL 10; 28→LOL 12. Marcador de peso molecular (1 Kb) a ambos extremos..... | 42 |
| <b>Figura 7.</b> Perfiles moleculares de ISSR obtenidos con los iniciadores: A) ISSR-03, B) 17899 A y C) PHV-06 en 70 colectas de chile Chiltepín. Marcador de peso molecular (1 Kb) en ambos extremos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 53 |
| <b>Figura 8.</b> Dendograma de 70 UBCs de chile Chiltepín construido utilizando el coeficiente se asociación de Dice y el método de ligamiento promedio UPGMA, a partir de la amplificación por PCR de 10 iniciadores de tipo ISSR.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 56 |
| <b>Figura 9.</b> Análisis de coordenadas principales de 70 UBCs de chile Chiltepín de la vertiente oriental mexicana.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 61 |
| <b>Figura 10.</b> Prueba de Mantel para las matrices de disimilitud genética y distancia geográfica ( $r=0.535$ ; $P < 0.0001$ ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 62 |
| <b>Figura 11.</b> Proyección bidimensional de las medidas de discriminación de las variables etnobotánicas para las primeras dos dimensiones.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 73 |
| <b>Figura 12.</b> Proyección bidimensional de las variables etnobotánicas y su relación con criterios geográficos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 74 |

## LISTA DE APÉNDICES

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Apéndice 1.</b> Estado de procedencia, coordenadas geográficas, y altitud (msnm) de las 70 colectas de chile Chiltepín.....    | 80 |
| <b>Apéndice 2.</b> Tejido de extracción de ADN, concentración en ng/μL y relación 260/280 de las 70 UBCs de chile Chiltepín. .... | 83 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por brindarme el financiamiento necesario para cursar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad de formar parte de su honorable matrícula y de continuar con mi preparación académica.

Al Dr. Juan Martínez Solís por la dirección del presente trabajo de investigación, por la motivación y la confianza.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por su valiosa asesoría y revisión. Por representar un ejemplo a seguir e inspirar siempre las ganas de seguir aprendiendo.

Al Dr. Fernando González Andrés por sus aportaciones precisas a este trabajo.

A los técnicos del laboratorio de Marcadores Moleculares M.C. María Elisa Alvarado Cano y Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por su paciencia y enseñanzas durante el desarrollo de la etapa experimental.

A los profesores del Posgrado de Horticultura quienes contribuyeron en mi crecimiento académico y personal.

Al señor Antero Hernández y la Ing. Sonia Bernabé por su apoyo en la realización de las colectas de los materiales empleados, así como de las entrevistas.

A Don Mateo por su apoyo, colaboración y enseñanzas en el Laboratorio de Semillas.

Al personal administrativo de la Coordinación del Posgrado de Horticultura, Angy, Anita y Rogelio.

A mis compañeros de posgrado Isma, Clau y Plácido por las carnitas, los esquites, las discadas, las mojarras y el amor.

## DATOS BIOGRÁFICOS

### Datos personales

Nombre: Rebeca Hernández Peña

Fecha de nacimiento: 18 de agosto de 1993

Lugar de nacimiento: Ciudad de México, México

CURP: HEPR930818MDFRXB09

Profesión: Licenciada en Biología

Cédula profesional: 10241553



### Desarrollo académico

Bachillerato      2009 – 2012      Escuela Nacional Preparatoria 6 “Antonio Caso”, UNAM.

Licenciatura      2012 – 2016      Facultad de Ciencias, Ciudad Universitaria, UNAM.

Maestría      2017 – 2018      Departamento de Fitotecnia, UACH.

## RESUMEN GENERAL

### **Caracterización molecular y aproximación etnobotánica del chile Chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) de la vertiente oriental de México<sup>1</sup>**

La diversidad genética es el resultado de largos procesos de selección y recombinación de genes, en los cuales la mutación, la hibridación y la migración constituyen las principales fuentes de variación. La conservación del acervo genético vegetal, es esencial para preservar atributos o características de interés, así como disponer de genes de importancia para el fitomejoramiento. El uso de germoplasma silvestre, es una alternativa viable frente a la pérdida de diversidad en plantas cultivadas. El chile Chiltepín es considerado el ancestro silvestre de las formas cultivadas de chile. Su fruto es altamente cotizado y se obtiene por recolección en poblaciones naturales. La principal limitante para su explotación comercial es la tasa de germinación que suele ser inferior al 5 %. En el presente estudio se exploró la variabilidad genética de 70 colectas de chile Chiltepín de la vertiente oriental mexicana, mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR. Adicionalmente se obtuvo información etnobotánica sobre conocimiento local, manejo y usos por medio de la aplicación de encuestas. El uso de diez iniciadores ISSR generó 134 bandas polimórficas. Se calcularon las distancias de Dice entre colectas y se realizó un análisis de agrupamiento con el método UPGMA, obteniéndose la formación de cinco grupos, los cuales se relacionaron con proximidad geográfica, rango altitudinal y apariencia de frutos. La mayor parte de la variabilidad genética en esta especie, se concentra al interior de las poblaciones, siendo la región Huasteca la más diversa. Con 31 variables etnobotánicas se llevó a cabo un análisis de correspondencia múltiple, con un 60.31 % de varianza acumulada en las primeras dos dimensiones. Las variables de mayor influencia fueron: destino y estado del producto, cantidad que se recolecta para venta, sitio de entrevista, precio por kilogramo, integrantes que se encargan de la venta, época de recolección y sitios de comercialización.

**Palabras clave:** Chile silvestre, diversidad genética, marcadores moleculares, ISSR.

---

<sup>1</sup>Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autora: Biol. Rebeca Hernández Peña

Director de Tesis: Dr. Juan Martínez Solís

## GENERAL SUMMARY

### **Molecular characterization and ethnobotanical approachment of wild chili pepper (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) of the eastern slope of Mexico<sup>2</sup>**

The genetic diversity is the result of long processes of gene selection and recombination, in which mutation, hybridization and migration are the main sources of variation. The conservation of the vegetal gene pool is essential to preserve attributes or characteristics of interest, as well as to have genes of importance for plant breeding. The use of wild germplasm is a viable alternative to the loss of diversity in cultivated plants. The Chiltepín pepper is considered the wild ancestor of the cultivated forms of chili. Its fruit is highly valued and it is obtained from harvesting in natural populations. The main limitation for commercial exploitation is the low germination rate, which is usually less than 5 %. In the present study, the genetic variability of 70 collections of Chiltepín pepper from the eastern Mexican slope was explored through the use of ISSR molecular markers. Additionally, ethnobotanical information on local knowledge, management and uses was obtained through surveys. The use of ten ISSR primers generated 134 polymorphic bands. The Dice distances among collections were calculated and a clustering analysis was performed with the UPGMA method, obtaining the formation of five groups, which were related to the geographical proximity, altitudinal range and appearance of the fruits. Most of the genetic variability in this species is concentrated within the populations, being the Huasteca region the most diverse. A multiple correspondence analysis with 31 ethnobotanical variables was carried out with an accumulative variance of 60.31 % in the first two dimensions. The variables of greatest influence were: the destination and condition of the product, the amount collected for sale, the interview site, the price per kilogram, the members who are responsible for the sale, the time of collection and the marketing sites.

**Key words:** Chiltepin wild pepper, genetic diversity, molecular markers, ISSR

---

<sup>2</sup>Thesis of Horticultural Sciences MSc program, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Biol. Rebeca Hernández Peña

Advisor: Dr. Juan Martínez Solís

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum annum* L.) es una de las hortalizas más utilizadas en el ámbito nacional e internacional. Debido a la gran variedad de tipos distribuidos en el país y, a que éstos no se encuentran en otros lugares del mundo, México es considerado el centro de origen y domesticación. Los procesos de dispersión, selección y adaptación a diferentes ambientes ecológicos, han dado como resultado la obtención de una gran cantidad de morfotipos, los cuales, constituyen un acervo genético de gran relevancia.

El chile es el octavo cultivo con mayor valor generado en la agricultura mexicana, alcanzando alrededor de 13 mil millones de pesos anualmente, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas, de las cuales se exportan cerca de 900 mil en fresco, en seco y en preparaciones. El estado de Chihuahua es el principal productor con 562 mil toneladas al año; le siguen los estados de Sinaloa y Zacatecas con 556 mil y 348 mil toneladas respectivamente. A escala internacional, México es el segundo productor de chiles, dedicando más de 140 mil hectáreas a su cultivo. Los tipos de mayor importancia económica son: jalapeño, serrano, poblano, morrón y habanero (SIAP, 2016).

El Chiltepín o chile de monte, es considerando el ancestro de todas las formas de chiles conocidas actualmente; se encuentra ampliamente distribuido en forma silvestre en México, principalmente en zonas bajas. El fruto es muy cotizado, y durante la época de mayor oferta llega a desplazar a otros tipos de chile por su agradable sabor y grado de pungencia, sobrepasando hasta 40 veces el valor de los chiles serranos y jalapeños (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004).

El mayor volumen de Chiltepín que se comercializa proviene de recolección de plantas silvestres. Existen pocas evidencias de la explotación comercial, debido en gran medida, a la dificultad en la germinación de la semilla, dadas sus características intrínsecas. En poblaciones naturales, la dispersión de las semillas es efectuada por las aves, las cuales consumen los frutos y el paso por su tracto digestivo favorece la escarificación de la testa.

El chiltepín es considerado como un recurso genético de importancia en el fitomejoramiento de los chiles cultivados. Su amplia distribución y variación morfológica muestran su alto grado de adaptabilidad ambiental, probablemente asociado con su diversidad genética (Rodríguez del Bosque, 2005). Los procesos de domesticación y selección han disminuido la variabilidad existente en los materiales comerciales; sin embargo, los parientes silvestres representan una fuente de genes primaria que permite la incorporación de características favorables tales como tolerancia o resistencia a plagas y enfermedades, así como el aumento en la cantidad y calidad de la producción.

Se han realizado análisis de diversidad basados en caracteres morfológicos, cuantitativos o morfométricos y cualitativos mediante el uso de métodos descriptivos, y en años recientes, se han utilizado herramientas moleculares para estudiar directamente el material genético de los individuos. La variabilidad genética en el chile es muy amplia, por lo que es importante realizar estudios que permitan identificar caracteres agronómicos de interés.

La caracterización y evaluación de la diversidad presente en colecciones vegetales silvestres, es central en el mantenimiento y mejora de la agricultura moderna ya que constituyen una alternativa viable. Su conocimiento permite llevar a cabo un uso, explotación y conservación racionales. En este sentido, los recursos fitogenéticos relacionados con el género *Capsicum* adquieren gran relevancia debido al potencial genético que presentan.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Explorar la variabilidad genética de 70 colectas de chile Chiltepín provenientes de la vertiente oriental de México, mediante el uso de marcadores moleculares del tipo ISSR.

### **Objetivos particulares**

Contribuir a la conservación y protección de los recursos fitogenéticos así como con futuros programas de mejoramiento de este cultivo.

Obtener información etnobotánica sobre el conocimiento local, manejo y usos del chile Chiltepín.

## **HIPÓTESIS**

Existe variabilidad genética entre las diferentes colectas de chile Chiltepín. El análisis molecular permitirá realizar el agrupamiento de accesiones de acuerdo a similitudes genéticas, así como identificar grupos de mayor diversidad.

## CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Diversidad genética

La diversidad genética en sentido amplio se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones que pertenecen a una misma especie. La biodiversidad, como producto, se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre dichas variaciones (Lowe *et al.*, 2004).

Una población está constituida por un grupo de individuos que pertenecen a la misma especie, comparten un área de distribución delimitada y son capaces de generar descendencia (Eguiarte *et al.*, 2007). La información génica portada por los miembros de una población particular constituye su acervo genético y, las diferencias genómicas y fenotípicas presentes en cada población suelen ser el resultado de largos procesos de selección (ya sea natural o artificial), de recombinación de genes y de la interacción del ambiente con los sistemas genéticos (Klug *et al.*, 2013).

Esta diversidad puede no ser aparente u observable en el fenotipo por lo que es necesario recurrir a distintos métodos. La forma más directa de estudiar la variación entre un conjunto de organismos, es mediante la comparación de secuencias nucleotídicas que integran los genes que portan los individuos de una población determinada. El reciente desarrollo de la Biología Molecular y las nuevas herramientas experimentales y estadísticas han permitido identificar y utilizar esta variación, cuyas fuentes principales son la mutación, la hibridación y la migración (Rao y Hodgkin, 2002).

La mutación es considerada como la principal fuente de variación, consiste en cambios aleatorios, que ocurren en baja frecuencia, en la secuencia normal de nucleótidos del material genético de un individuo; éstas pueden ocurrir de forma espontánea, por ejemplo, durante la replicación del ADN o ser inducidas mediante radiaciones ionizantes (rayos X,  $\gamma$  o luz ultravioleta) o químicos mutagénicos (agentes intercalantes, alquilantes o desaminantes). Sólo aquellas mutaciones que ocurren en células germinales, son transmitidas a la descendencia generando variación en las poblaciones (Krebs *et al.*, 2018).

El conocimiento de la diversidad genética puede ser utilizado en diferentes ámbitos, por ejemplo: a) evaluación de la capacidad de respuesta frente a cambios ambientales naturales o inducidos; b) estudio de riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos; c) determinación de la riqueza genética y de su distribución geográfica; d) entendimiento de la forma, la velocidad y las causas de la pérdida de la biodiversidad; e) evaluación de los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones y especies nativas; f) planeación de estrategias de mejoramiento y conservación de recursos fitogenéticos (Piñero *et al.*, 2008).

La domesticación vegetal es el resultado de un proceso de selección artificial unidireccional de caracteres deseables llevado a cabo por el hombre, con el propósito de permitir la adaptación a condiciones de cultivo (Gepts, 2004). Esto provoca cambios en las frecuencias fenotípicas y genotípicas de las poblaciones que se encuentran bajo manejo, generando divergencias respecto a sus ancestros silvestres, lo cual implica una pérdida gradual de la diversidad alélica, así como de la habilidad de adaptación a los ambientes naturales y la disminución de la capacidad reproductiva y de dispersión (Casas *et al.*, 2007).

El uso de germoplasma silvestre es una alternativa viable frente a la pérdida de diversidad en plantas cultivadas debido a los procesos de selección y domesticación. Esta relación genética cercana posibilita el flujo de genes, constituyéndose en una fuente primaria de variabilidad y permitiendo la incorporación de rasgos específicos que están presentes sólo en las plantas silvestres debido a las condiciones del medio natural. Ejemplos de éstos caracteres son la tolerancia a temperaturas altas o bajas, sequías, condiciones edáficas particulares como salinidad o acidez, así como la producción de metabolitos secundarios implicados en la respuesta a la incidencia de plagas y/o enfermedades (Pickersgill, 2007).

## 2.2 Conservación de recursos fitogenéticos

Desde el punto de vista de la conservación de recursos fitogenéticos, así como del mejoramiento vegetal, se persigue como principal objetivo estudiar, medir y determinar la variación que existe entre y dentro de los individuos de una misma población o de poblaciones geográficamente distantes (Donald, 2004).

La diversidad genética contribuye a la productividad, sostenibilidad y estabilidad de los sistemas agrícolas. La pérdida acelerada interfiere con la satisfacción de la creciente demanda de productos agroalimentarios, con la conservación de la variabilidad genética, con los servicios ecosistémicos y, por lo tanto, con el bienestar de las poblaciones humanas (Kessler *et al.*, 2007).

Existen tres puntos clave en relación con la conservación de los recursos genéticos: estudiar y clasificar la diversidad biológica, detener la pérdida de los ecosistemas y alimentar una población humana creciente. De manera general, hay dos formas de conservación que no son excluyentes entre sí: la primera denominada *in situ* y la segunda *ex situ*. La conservación *in situ* se refiere al mantenimiento y/o recuperación de ecosistemas y hábitats, así como poblaciones viables en su entorno natural, mientras que la *ex situ* consiste en la protección de componentes de la diversidad fuera de su ambiente original (Brush, 2000).

La pérdida de agrobiodiversidad, como conjunto, ha sido propiciada principalmente por cambios en el uso de suelo y de la cobertura vegetal, resultando en la transformación de los ambientes por deforestación y/o desertificación. Lo anterior ha llevado a pensar que la sostenibilidad de las áreas agrícolas puede involucrar un continuo de sistemas de manejo, desde explotaciones modernas intensivas hasta sistemas tradicionales (Pascual y Perrings, 2007).

En la Conferencia Técnica de FAO/IBP sobre exploración, utilización y conservación de recursos genéticos vegetales, reunida a finales de la década de 1960, se llevó a cabo la definición de una estrategia global de conservación, la cual se derivó, especialmente, de la preocupación por la desaparición de variedades de agricultor y materiales silvestres relacionados, debido a la introducción de cultivares mejorados. La estrategia de

conservación se vio favorecida por la existencia de técnicas de almacenamiento *ex situ*, a largo plazo y en frío lo que condujo al establecimiento de colecciones de germoplasma conocidas como bancos de genes (Hammer *et al.*, 2003). Como consecuencia, en la década de 1970 se produjo un esfuerzo mundial de colecta y conservación de poblaciones domesticadas (variedades de agricultor, cultivares obsoletos, poblaciones de mejoramiento, variedades mejoradas y materiales especiales) y de ejemplares silvestres relacionados con plantas cultivadas (Brown, 2000).

La conservación de los recursos genéticos vegetales es esencial para preservar atributos o características de interés, así como para disponer de genes de importancia para el fitomejoramiento (Charafi, 2008). Desde este punto de vista, los recursos fitogenéticos constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria, ya que, de forma directa o indirecta, sostienen los medios de subsistencia. Por lo tanto, su conservación y uso sostenible son necesarios para garantizar la producción agrícola y satisfacer los crecientes desafíos ambientales y el cambio climático (FAO, 2010).

### **2.3 Caracterización de germoplasma**

Los patrones de diversidad genética vegetal resultan de la interacción de factores tales como: mutación, migración, recombinación, selección y deriva. Los tres primeros contribuyen de forma positiva al aumento de la variación mientras que, los dos últimos, la reducen (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

El acervo genético de una población, puede expresarse en caracteres visibles o fenotípicos o estar contenido en características no observables denominadas genotípicas. El objetivo principal de la caracterización vegetal es medir la variabilidad de una colección mediante el uso de descriptores definidos (Franco e Hidalgo, 2003).

La caracterización de cierto material vegetal particular consiste en la determinación de atributos específicos que permitan diferenciarlo de manera clara de otros entes similares o relacionados. Generalmente con propósitos de clasificación, identificación y/o determinación de organismos, análisis de diversidad genética, gestión de bancos de germoplasma, definición de variedades comerciales, conservación y uso racional de los

recursos fitogenéticos y búsqueda de marcadores útiles para el mejoramiento vegetal (González-Andrés, 2001).

Un marcador genético es una entidad heredable que está asociada con cierto rasgo de interés y que puede ser utilizado como una herramienta de selección (Staub *et al.*, 1996). Existen varios tipos de caracteres que son utilizados con frecuencia, por ejemplo, morfológicos, citológicos, bioquímicos, de ADN, ecogeográficos, fisiológicos, agronómicos, organolépticos, entre otros (González-Andrés, 2001).

Para llevar a cabo la caracterización y evaluación de materiales vegetales se utilizan caracteres seleccionados que son útiles en la descripción de una muestra. Los estados de un carácter o descriptor son los valores que puede asumir en las diferentes escalas de medición ya sea nominal o categórica, ordinal, de intervalo o de proporción. Estos descriptores deben presentar preferentemente características inherentes como: fácil observación, alto poder discriminante, baja influencia ambiental y homología (Hidalgo, 2003).

De acuerdo al enfoque de la caracterización se lleva a cabo la selección del objeto de estudio definido como unidad básica de caracterización (UBC), ya sea a nivel de individuo, de población o de especie, así como, del tipo de caracteres homólogos empleados para realizar el análisis. La integración y uso conjunto de los sistemas de caracterización disponibles permite obtener información más completa y confiable, así como resultados robustos y reproducibles (González-Andrés, 2001).

**2.3.1 Caracterización morfológica.** Tradicionalmente la caracterización e identificación de organismos vegetales se ha basado en el empleo de rasgos morfológicos y/o agronómicos. Estos caracteres cuantitativos o morfométricos y cualitativos, son usualmente controlados por un solo locus y pueden ser utilizados como marcadores genéticos si su expresión es reproducible en diferentes ambientes (Staub *et al.*, 1996). No obstante, su uso presenta algunas limitaciones pues su expresión diferencial puede estar sujeta a factores fenológicos, climáticos, edáficos o nutrimentales. Por otro lado, se deben incluir todas las estructuras de la planta y ésta debe encontrarse en estado adulto, lo cual puede dificultarse en especies cuyos ciclos de vida son

prolongados. Además, ciertas modificaciones epigenéticas limitan el número de caracteres de alta confiabilidad evaluados en poblaciones segregantes (Tanksley, 1983).

Con el propósito de reducir la heterogeneidad y uniformizar los caracteres utilizados, se han desarrollado listas de descriptores simplificando la recuperación de la información. Estas guías se elaboran considerando los antecedentes para especies o géneros relacionados y restringiendo el número de características que permiten estimar la variabilidad, discriminar grupos y diferenciar accesiones individuales (Abadie y Berretta, 2010).

La definición de las variables puede ser adaptada a cada caso específico, por ejemplo, para especies silvestres o sin estudios previos la propuesta preliminar de caracteres a ser registrados se realiza con base en organismos afines y conocimiento empírico. Posteriormente, el listado se ajusta por medio de herramientas estadísticas que permiten seleccionar descriptores con alto poder discriminante (Sevilla y Holle, 2004; Abadie y Berretta, 2010).

**2.3.2 Caracterización molecular.** Los avances en Biología Molecular han permitido el desarrollo de métodos y técnicas de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores genéticos, fenotípicamente neutros, los cuales son útiles para detectar variabilidad y son aplicables en cualquier etapa del ciclo de vida y a cualquier tejido vegetal. Éstos reducen el número de caracteres en estudio y están libres de efectos ambientales, pleiotrópicos, epistáticos y epigenéticos (Powell, 1992; Singh *et al.*, 2008). En sentido amplio, un marcador molecular es cualquier diferencia no típica controlada genéticamente, considerando ciertas moléculas orgánicas o inorgánicas presentes en un organismo, por ejemplo: proteínas, ADN, ARN, metabolitos secundarios, entre otras (Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores moleculares presentan herencia Mendeliana simple y para que sean considerados de utilidad deben cumplir con ciertas características deseables, por ejemplo, alto grado de polimorfismo o variación, especificidad de locus, distribución amplia en el genoma, reproducibilidad, facilidad en la expresión, simplicidad en la identificación y análisis y posibilidad de automatización (Singh *et al.*, 2008).

Históricamente los primeros marcadores desarrollados fueron las isoenzimas, que son formas moleculares múltiples de enzimas, es decir, variantes alélicas codificadas por genes estructurales presentes en un individuo. Tienen funciones similares, pero difieren en sus características isoelectricas y por lo tanto en su movilidad electroforética (Markert y Moller, 1959). Estos cambios se deben a mutaciones que provocan el remplazo de aminoácidos y alteran la carga eléctrica neta y la conformación espacial tridimensional. Se puede distinguir más de un locus, su expresión es codominante, son selectivamente neutras y constituyen estimadores básicos de la composición genética de una población, ya que se emplean para cuantificar frecuencias alélicas y genotípicas (Brown *et al.*, 1979).

Por otro lado, los marcadores de ácidos nucleicos se basan fundamentalmente en el análisis de diferencias en secuencias cortas entre individuos. Desde el punto de vista molecular esta variación, denominada polimorfismo, deriva de cambios espontáneos en el material genético y puede medirse a través de diferentes técnicas, las cuales se agrupan de acuerdo a la metodología empleada y a los componentes específicos para cada reacción. De este modo se han empleado herramientas prácticas que se fundamentan en la hibridación molecular con sondas marcadas, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la combinación de las dos anteriores. Adicionalmente, en años recientes, se ha incorporado el proceso de secuenciación. Cada marcador presenta herencia mendeliana, ya sea del tipo dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998).

**2.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Después del descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1953 se han desarrollado métodos sensibles y reproducibles que han permitido estandarizar y automatizar los protocolos de estudio de ácidos nucleicos. Una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis (1990). Es una reacción enzimática *in vitro* que permite amplificar un segmento específico de ADN de manera exponencial, generando millones de copias por medio de ciclos repetitivos que alternan temperaturas de incubación particulares (Templeton, 1992).

Esta técnica altamente específica, rápida, sencilla y versátil se puede llevar a cabo con pequeñas cantidades de ADN blanco o molde (de 1 a 20 ng). Los componentes principales de la reacción son:

- a) Iniciadores o primers.** Son secuencias cortas de oligonucleótidos complementarios al ADN molde utilizados para sintetizar una nueva cadena a partir del OH<sup>-</sup> libre en su extremo 3'. Su composición de G+C debe oscilar entre 40 y 60 % y no deben ocurrir apareamientos internos por autocomplementariedad. La distancia que separa los sitios donde se aparean los iniciadores (sentido y antisentido) determina el tamaño del producto de amplificación. Las parejas de *primers* deben tener una temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) similar, la cual se calcula como se indica a continuación (Barrera-Saldaña *et al.*, 1993):

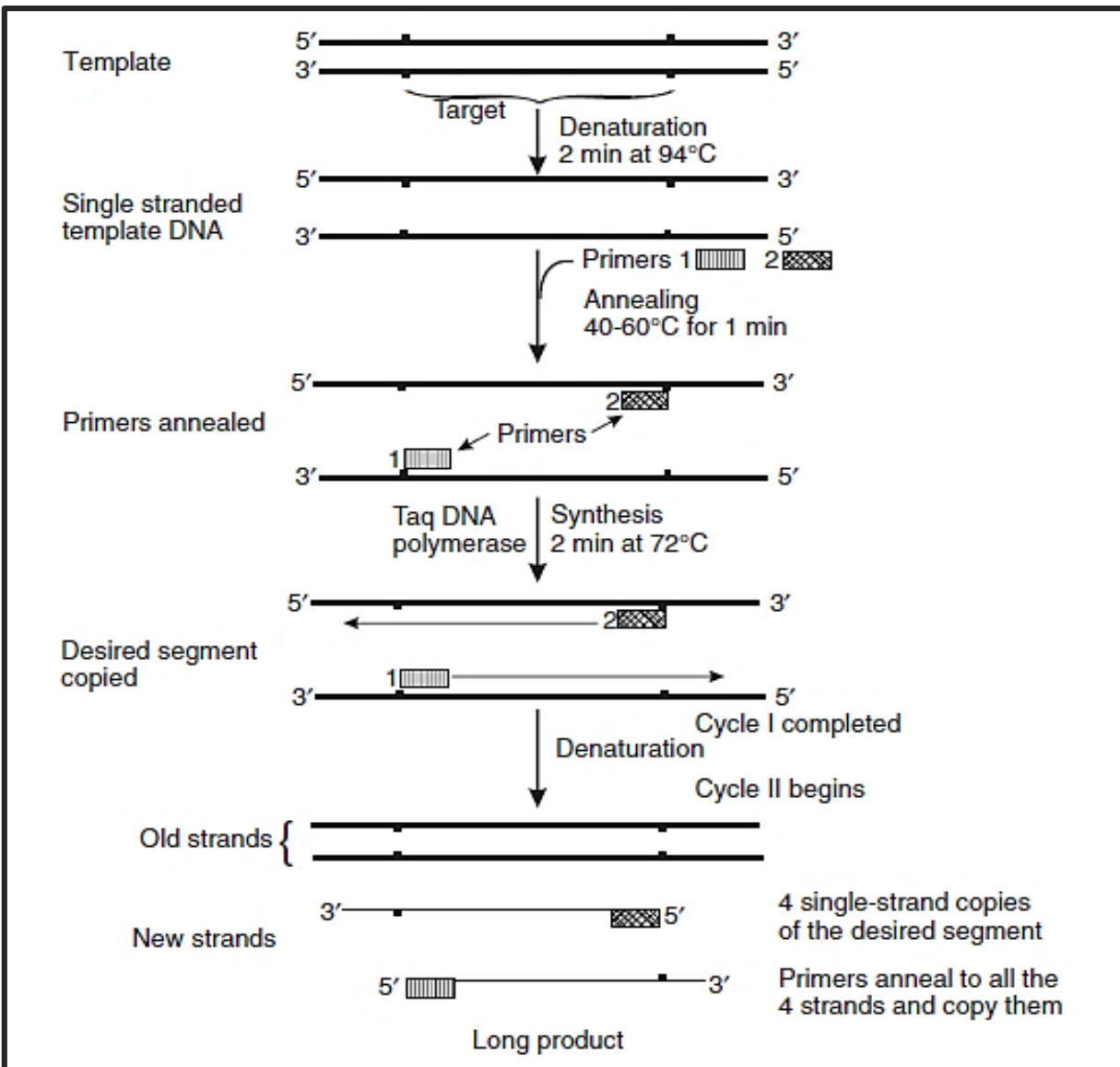
$$T_m = (2^{\circ}\text{C})(A+T) + (4^{\circ}\text{C})(G+C)$$

- b) Desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs).** Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP); distinguibles por sus bases nitrogenadas) constituyen los bloques de construcción de las nuevas cadenas de ADN. Su concentración afecta de manera directa la fidelidad y especificidad de la reacción. Ésta generalmente oscila entre 0.2 y 1 mM (Saiki *et al.*, 1988).
- c) Enzima polimerasa.** Se encarga de la catálisis de la reacción, sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de los iniciadores en dirección 5' → 3'. Incorpora dNTPs complementarios a la hebra molde por medio de la formación de enlaces fosfodiéster. Las enzimas más utilizadas por su capacidad termoestable son la Taq proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y la Vent de *Thermococcus litoralis*. Sus temperaturas óptimas de polimerización se encuentran alrededor de los 72 °C, e incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo (Saiki *et al.*, 1988; Cariello *et al.*, 1991).
- d) Magnesio.** Cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción [0.5 – 2.5 mM], puede estar incluido en la solución amortiguadora o adicionarse de forma independiente (Barrera-Saldaña *et al.*, 1993).

- e) *Solución amortiguadora (Buffer)*. Compuesta generalmente por Tris-HCl que presenta un pH  $\approx 8$  a temperatura ambiente. En algunos casos se recomienda el uso de adyuvantes, para aumentar la fidelidad y especificidad, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) que sirve para disminuir estructuras secundarias en el ADN; detergentes como tween 20 o Tritón X-100, que ayudan a estabilizar a la enzima, y, finalmente, polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, o seroalbúmina bovina (Pomp y Medrano, 1991).
- f) *Agua*. Utilizada como disolvente en la reacción, debe ser destilada o de calidad HPLC y estar libre de nucleasas e impurezas.

Cada ciclo de PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, alineamiento y extensión (Figura 1). En la primera etapa se somete el ADN molde a un incremento de temperatura de  $\approx 94^{\circ}\text{C}$  durante un minuto para conseguir romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las cadenas de la doble hélice separándolas y dejando expuesta la secuencia que contienen. En la práctica se ha sugerido realizar un ciclo previo de cinco minutos para asegurar la desnaturalización completa (Barrera-Saldaña *et al.*, 1993).

Una vez transcurrido el tiempo se procede a la segunda etapa, en la cual se da el alineamiento específico o hibridación molecular de los iniciadores, a una temperatura determinada por la composición de bases del mismo ( $40\text{-}60^{\circ}\text{C}$ ). Los *primers* proveen un grupo OH libre en el extremo 3' que permite que se lleve a cabo la adición enzimática de nucleótidos. En la última etapa la polimerasa utiliza como molde una cadena sencilla de ADN e incorpora dNTPs en dirección  $5' \rightarrow 3'$  a una temperatura  $\approx 72^{\circ}\text{C}$  por dos a cinco minutos dependiendo el tamaño de los fragmentos esperados. Al finalizar todos los ciclos mencionados anteriormente, se recomienda realizar un último periodo de alargamiento o extensión de al menos cinco minutos, con el fin de asegurar que los productos de amplificación tengan la misma longitud, es decir, que estén completamente terminados (Barrera-Saldaña *et al.*, 1993; Singh y Singh, 2015).



**Figura 1.** Representación esquemática de los tres pasos principales de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Singh y Singh, 2015).

Los marcadores de ADN basados en PCR fueron desarrollados en la década de los 90's reemplazando a los marcadores de hibridación debido a que requieren pequeñas cantidades de material genético y éste puede no ser de muy buena calidad. Son rápidos, fáciles de usar y permiten la automatización. Estos sistemas se clasifican de acuerdo al tipo de iniciadores utilizados (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Clasificación de los sistemas de marcadores moleculares basados en amplificación por PCR.

| Categoría                                           | Marcador*               | Observaciones                                                   |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Iniciadores de secuencia arbitraria                 | RAPD, DAF, AP-PCR, ISSR | Fáciles de implementar, baja reproducibilidad.                  |
| Iniciadores de secuencia específica                 | SCAR, STS, SSR          | Exigencias técnicas considerables. Alta reproducibilidad.       |
| Combinación de iniciadores aleatorios y específicos | SRAP, TRAP, SCoT        | Fáciles de implementar. Requieren bases de datos de secuencias. |
| Combinación con enzimas de restricción              | AFLP, CAPS              | Técnicamente muy demandantes.                                   |

\**AFLP* polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, *AP-PCR* reacción en cadena de la polimerasa de iniciadores arbitrarios, *CAPS* secuencia de restricción amplificada y polimórfica, *DAF* amplificación de huella genética de DNA, *ISSR* inter secuencia simple repetida, *RAPD* ADN polimórfico amplificado al azar, *SCAR* región amplificada caracterizada por secuencia, *SCoT* marcador de codón de inicio marcado, *SRAP* polimorfismo en la amplificación de secuencias relacionadas, *SSR* secuencia simple repetida o microsatélites, *STS* sitios de secuencia etiquetada, *TRAP* polimorfismo en la amplificación de regiones etiquetadas (Singh y Singh, 2015).

**2.3.2.2 ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats).** Los ISSRs o inter-secuencia simple repetida son marcadores moleculares dominantes basados en la amplificación mediante PCR. Generan fragmentos de 100 a 3,000 pares de bases localizados entre regiones microsatélite adyacentes y de orientaciones opuestas (Singh *et al.*, 2008).

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN repetitivo que se agrupan en tándem, su longitud va de 1 a 6 pb (Singh *et al.*, 2008) o hasta 10 (Hajeer *et al.*, 2000). Son abundantes, ya que virtualmente, pueden constituir del 30 al 90 % del genoma de los eucariontes. Se encuentran ampliamente distribuidos y en el caso de plantas, los dinucleótidos más comunes y altamente polimórficos son: (AT)<sub>n</sub> y (GA)<sub>n</sub>; además existen repeticiones conformadas por trinucleótidos como (AAG)<sub>n</sub> y (AAT)<sub>n</sub> y algunos tetranucleótidos (Staub *et al.*, 1996; Singh y Singh, 2015).



Los productos de la PCR pueden ser marcados radioactivamente con  $^{32}\text{P}$  o  $^{33}\text{P}$  y posteriormente separados en un gel de poliacrilamida para visualizarse por medio de autorradiografía o bien, colocarse en un gel de agarosa o poliacrilamida y realizar tinción con bromuro de etidio o nitrato de plata, respectivamente. El rendimiento promedio de una reacción típica es de 20 a 100 bandas, dependiendo de la especie en estudio y del tipo de iniciador empleado, así como la temperatura de alineamiento (Godwin *et al.*, 1997).

La variación alélica de este sistema multiloci de alto rendimiento, consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados, los cuales, debido a que se encuentran dispersos aleatoriamente por todo genoma (principalmente nuclear), son altamente polimórficos y medianamente reproducibles (Culley y Wolfe, 2001).

Su principal ventaja radica en que no se requiere información previa sobre las secuencias para el diseño de los iniciadores y la cantidad de ADN molde requerida es sumamente baja (5 a 50 ng por reacción). Además, debido a que se pueden analizar varios loci de forma simultánea, tienden a identificar niveles significativos de variación (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los perfiles obtenidos mediante marcadores ISSR pueden ser utilizados en análisis de diversidad genética, de parentesco, en identificación de clones y cepas, en estudios taxonómicos de especies cercanamente relacionadas, en mapeo genético y construcción de mapas de ligamiento (Zietkiewicz *et al.* 1994; Godwin *et al.* 1997).

Los ISSRs han sido utilizados en plantas cultivadas desde finales de la década de los 90s, por ejemplo, en maíz (Kantely *et al.*, 1995), en sorgo (Yang *et al.*, 1996) y en chile (Thul *et al.*, 2012). Del mismo modo, se ha implementado su uso en estudios de variación poblacional en especies silvestres (Wolfe *et al.*, 1998).

## 2.4 Generalidades del chile Chiltepín en México

### 2.4.1 Taxonomía

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Género:** *Capsicum* L., 1753

**Especie:** *annuum* L., 1753

**Variedad:** *glabriusculum*

(Dunal) Heiser & Pickersgill, 1975

El género *Capsicum* es un grupo monofilético que incluye 31 especies que se han agrupado y diferenciado utilizando principalmente caracteres fenotípicos como la morfología de la flor y/o de los frutos (Moscone *et al.*, 2007); cinco de ellas se consideran domesticadas: *C. annum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., y *C. pubescens* R. (Zhigila *et al.*, 2014).

La especie *C. annum* L. es la más ampliamente distribuida en México, su taxonomía ha sido objeto de debate por muchos años dado que existe una amplia diversidad genética y morfológica en tipos, colores, formas, tamaños, sabores y contenidos fitoquímicos (Zhigila *et al.*, 2014). Debido a esto, el chile Chiltepín ha recibido diferentes nombres para identificar esta variedad, tales como: *C. annum* L. var. *minus* (Figherhuth), *C. annum* L. var. *baccatum* (Terpó), *C. annum* L. var. *minimum* (Heiser y Pickersgill) y *C. annum* var. *aviculare* (D'Arcy y Eshbaugh) (Long-Solís, 1998); sin embargo, actualmente el nombre científico aceptado es *C. annum* L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser y Pickersgill (Heiser y Pickersgill, 1975; Wiersema y León, 1999).

### 2.4.2 Origen y distribución

El chile es una de las primeras plantas que fueron domesticadas en el continente americano. El género *Capsicum* es nativo del Centro y el Sur de América (Perry *et al.*, 2007). México fue determinado como el centro de origen, domesticación y diversificación de la especie *Capsicum annuum* L. Las evidencias arqueológicas más antiguas fueron encontradas en las cuevas de Ocampo en la Sierra de Tamaulipas (7,000-5,000 a.C.) y Coxcatlán en el Valle de Tehuacán (6,000-4,000) (Perry *et al.*, 2007; Kraft *et al.*, 2014).

El Chiltepín es considerado el progenitor silvestre de *C. annuum* var. *annuum* y un importante recurso genético para el mejoramiento de los chiles cultivados (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009; González-Jara *et al.*, 2011). Se distribuye desde el Norte de Perú, Colombia, América Central, México y el Suroeste de Estados Unidos (Arizona, Nuevo México y Texas) (Votava *et al.*, 2002; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

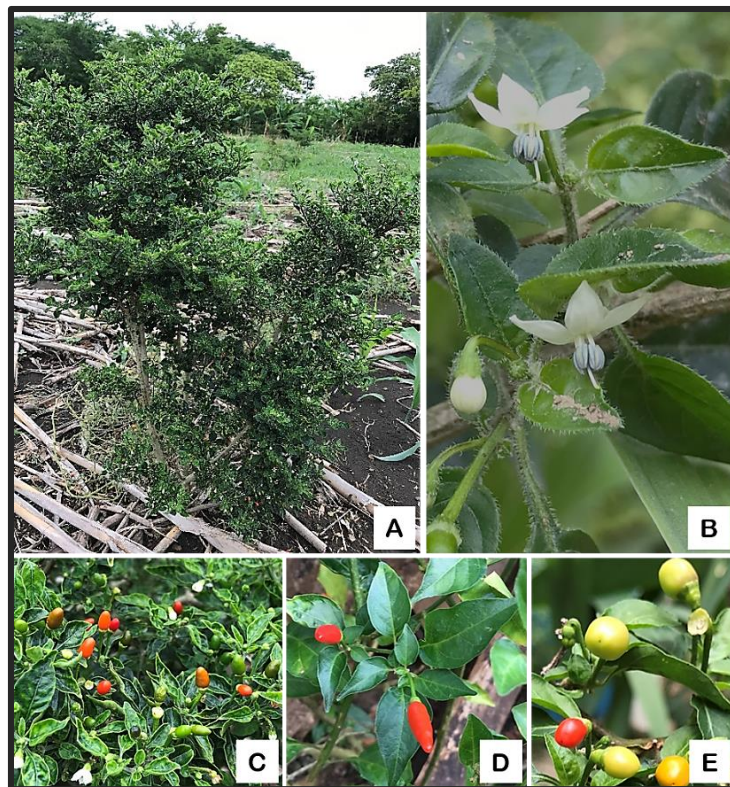
Particularmente en México se encuentra a lo largo de la costa del Pacífico desde Sonora hasta Chiapas y alrededor de la península de Yucatán y el Golfo de México, además en los estados de Baja California, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla (Figura 3) (Medina *et al.*, 2002; González-Jara *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Mapa de la distribución del chile Chiltepín (*C. annuum* L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill) en México (Montes, 2010).

### 2.4.3 Aspectos botánicos

El chile Chiltepín es un arbusto silvestre perenne de reproducción autógama, que mide de 0.5 a 2 metros de altura, posee un tallo erecto ramificado. Las hojas son ovaladas y tienen peciolo delgado de 1.0 a 2.5 cm de longitud. Sus flores son solitarias (raramente en pares) y se encuentran en las axilas de las hojas. Presentan cáliz acampanado que termina en cinco dientes, la corola es blanca o verdosa, mide de 6.0 a 9.0 mm de diámetro y está formada por cinco lóbulos unidos en la base. El androceo está compuesto por cinco estambres con anteras generalmente azuladas y levemente unidas entre sí. El fruto es una baya decidua redonda u oblonga de 3.0 a 6.0 mm de diámetro con pedúnculo alargado y que crece de forma eréctil. En estado inmaduro presenta una coloración verde obscuro debido a altas concentraciones de clorofila, mientras que al madurar se torna de color rojo debido a la acumulación de pigmentos como licopersinas. Las semillas son numerosas, aplanadas, blancas o amarillas, poseen un embrión curvo y miden de 2.5 a 3.0 mm de longitud (Figura 4) (Nabhan, 1985; Votava *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Morfología del chile Chiltepín. A: Hábito arbustivo de la planta; B: Flores solitarias axilares; C, D y E: Variedad de frutos.

El color rojo intenso de los frutos atrae a diversas aves, las cuales los consumen y dispersan las semillas. En condiciones naturales generalmente se desarrollan bajo la sombra de plantas nodrizas (Nabhan *et al.*, 1990; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

Las plantas de Chiltepín alcanzan su madurez reproductiva entre los seis y diez meses de edad. La floración inicia en el mes de mayo y continua hasta septiembre, mientras que la fructificación abarca de junio a octubre; sin embargo, estos periodos varían dependiendo de las condiciones particulares de cada región (Molina *et al.*, 2009).

Debido a la distribución tan amplia y a la evidente variación morfológica, se han definido ecotipos regionales distintivos (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004) entre los que destacan:

*Variante noreste.* Arbusto con abundante ramificación dicotómica horizontal, de entrenudos largos y posición erecta bajo sombra; entrenudos cortos y posición semi-erecta postrada en ambientes soleados. Presenta antocianinas en los nudos y en bandas longitudinales en el tallo. Hojas verde claro, delgadas y de nervaduras no muy marcadas, sin pubescencia. Frutos redondos u oblongos de 6.0 a 9.0 mm de longitud polar y 5.0 a 7.0 mm de diámetro. Tienen color rojo intenso al madurar y no presentan antocianinas, las cuales suelen provocar tonalidades oscuras que demeritan la calidad visual.

*Variante Chiapas/Oaxaca.* Las plantas son vigorosas, de crecimiento erecto y de hojas ovales verde oscuro. Los frutos son de mayor tamaño que los de la variante noreste. El alto contenido de antocianinas que presentan, provoca un “manchado oscuro” en poco más de la mitad del fruto.

*Variante noroeste.* Este arbusto presenta pubescencia en tallos y hojas, éstas últimas suelen ser ovales. Los frutos son de tamaño, forma y sabor similares a la variante noreste.

*Variante Huasteca.* Son plantas vigorosas y de crecimiento erecto, con hojas color verde oscuro brillante, lanceoladas, gruesas, cerosas y con nervaduras centrales y laterales bien definidas. Los frutos son alargados, de aproximadamente 10 mm de largo y 4.0 mm de ancho.

*Variante Yucatán.* Plantas vigorosas, rústicas y muy prolíficas. Los frutos pueden ser redondos de color amarillo al madurar o alargados y rojos en la madurez. Tienen un sabor peculiar.

#### **2.4.3.1 Citogenética**

Las especies cultivadas del género *Capsicum*, así como sus parientes silvestres, presentan un número cromosómico de  $2n = 2x = 24$  (Pickersgill, 1997). Sin embargo, algunas de las especies que se desarrollan típicamente en América del Sur, el Sureste de Brasil y en Querétaro, México, como son *C. ciliatum*, *C. buforum*, *C. campylopodium*, *C. cornutum*, *C. schottianum* y *C. villosum* tienen 26 cromosomas (Hernández-Verdugo *et al.*, 1999).

Las especies de importancia comercial *C. chinense* y *C. frutescens* presentan 11 pares de cromosomas metacéntricos y un par acrocéntrico, contrastando con *C. annuum* que posee 10 pares metacéntricos y dos acrocéntricos (Lanteri, 1991; Romero-da Cruz *et al.*, 2017).

Los análisis cariotípicos han indicado variación en el tamaño cromosómico. En *C. annuum* éste varía de 2.1 a 9.9  $\mu\text{m}$ , principalmente dentro de los tipos chiltepín, jalapeño, mirasol y pánuco (Teodoro-Pardo *et al.*, 2007). Sin embargo, en las poblaciones silvestres, la variación cariotípica puede ser mayor que la interespecífica (Kuriachan, 1981).

#### **2.4.4 Importancia económica**

El chile (*Capsicum* sp) es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel nacional e internacional. La producción, en sus diferentes variedades, alcanzó 2.3 millones de toneladas en 2016, con un valor aproximado de 22 mil 500 millones de pesos. El consumo per cápita de chile en México es de 16 Kg al año y se cultiva una superficie de al menos 149 mil hectáreas, principalmente en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas y Durango. Además, representa cerca del 20 % de la producción de hortalizas en el país. A nivel mundial, México se ubica como el segundo productor de chile verde y sus principales destinos de exportación son Estados Unidos, Canadá y España (SAGARPA, 2016).

Los chiles y pimientos ocupan el quinto puesto dentro de los 20 productos principales comercializados internacionalmente. Dentro del sector agrícola, constituyen el tercer sitio en importancia, precedidos sólo por el jitomate y el aguacate (SAGARPA, 2016).

Actualmente existen pocas evidencias del cultivo del chile Chiltepín en México, por lo tanto, se asume que el mayor volumen comercializado se obtiene a partir de recolección en poblaciones silvestres. Esta actividad suele representar un ingreso familiar local importante para las comunidades rurales (Bañuelos *et al.*, 2008; González-Jara *et al.*, 2011).

En los estados de Sonora y Tamaulipas se han desarrollado planes de manejo para esta especie, los cuales incluyen características generales de las áreas de establecimiento, acondicionamiento del sistema de riego, selección y tratamiento de las semillas para favorecer la germinación y prácticas agronómicas después del trasplante como podas y procedimiento de cosecha (Molina *et al.*, 2009). Paralelamente, en la región Huasteca del estado de Veracruz, se han reportado pequeñas plantaciones de temporal (Montes, 2010).

Debido al modelo de recolección y comercialización existen pocos datos que indiquen la cantidad de producción y las ganancias generadas. En el año 2008 se reporta una superficie cosechada a nivel nacional de 1,035 ha, de las cuales el 98.5 % corresponden al estado de Veracruz (Montes, 2010). La producción estimada en México es de 50 toneladas métricas por año (Votava *et al.*, 2002) y las exportaciones de frutos rojos en seco a Arizona y California sobrepasan las seis toneladas (Montes, 2010).

El alto grado de aceptación que tienen los chiles silvestres ha contribuido a que exista una demanda constante y creciente por este producto. El Chiltepín es apreciado y cotizado debido a su agradable sabor y grado de pungencia (100,000-200,000 unidades Scoville); aunado a esto, posee propiedades que no irritan el sistema digestivo (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). En ciertas épocas del año llega a desplazar a otros tipos de chile sobrepasando hasta 40 veces el valor de los jalapeños y serranos (Laborde y Pozo, 1982; Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004). Dentro del territorio mexicano el precio del producto es muy variable, dependiendo de la época del año, así como del sitio de recolección y venta (Cuadro 2) (Montes *et al.*, 2006).

**Cuadro 2.** Precio mínimo y máximo en pesos del chile Chiltepín por región geográfica en México.

| Región    | Precio mínimo en pesos<br>(\$ por kilo) | Precio máximo en pesos<br>(\$ por kilo) |
|-----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Noroeste  | 120                                     | 600                                     |
| Huasteca  | 80                                      | 140                                     |
| Sonora    | 450                                     | 700                                     |
| Querétaro | 80                                      | 100                                     |

(Fuente: Montes *et al.*, 2006)

El principal uso del Chiltepín es el alimenticio; es un fruto rico en compuestos fenólicos y flavonoides con capacidades antioxidantes como luteolina, catequina y resveratrol, además es fuente de capsaicinoides, capsinoides, carotenoides, tocoferoles (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y compuestos volátiles (Wahyuni *et al.*, 2013; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

#### **2.4.5 Problemática comercial**

La principal limitante para la explotación comercial a gran escala del chile Chiltepín es la latencia de la semilla, lo cual ocasiona una baja germinación que, en el medio natural, suele ser inferior al 5 % (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004). Esto se atribuye a la impermeabilidad y dureza de la cubierta seminal, a la baja permeabilidad del endospermo y a una latencia profunda en la que se encuentra el embrión (Araiza *et al.*, 2011).

La cera epicuticular y la testa dura evitan la absorción de agua. Esta característica favorece la supervivencia de la especie en su hábitat natural ya que, aunque exista humedad, no todas las semillas germinan al mismo tiempo; sin embargo, es una limitante para su explotación (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004). Los mecanismos que regulan el inicio de la germinación se encuentran bajo presiones selectivas; así, la variación de la capacidad germinativa entre y dentro de las especies se puede interpretar como una adaptación a las condiciones en que se desarrollan (Meyer *et al.*, 1997).

Se han realizado estudios previos para identificar mecanismos que aumenten considerablemente la tasa de germinación utilizando métodos físicos y químicos, tomando como referencia tratamientos de acondicionamiento metabólico utilizados en

otras especies hortícolas. Se ha reportado mayor efectividad mediante el uso de ácido giberélico a una concentración de 5,000 ppm. Este compuesto es un fitorregulador que activa proteínas que degradan el endospermo de la semilla, permitiendo la movilización de las reservas hacia el embrión (Chen y Bradford, 2000; Araiza *et al.*, 2011).

#### **2.4.6 Aspectos etnobotánicos**

En México el chile es uno de los cultivos de mayor trascendencia e identidad cultural. Es un fruto de gran consumo popular, especialmente en estado fresco, aunque también se comercializa procesado en forma de salsas, polvo y encurtidos. El chile Chiltepín representa una fuente alimenticia, medicinal y generadora de recursos estrechamente ligada a comunidades rurales (Long-Solís, 1998; Medina *et al.*, 2000).

Actualmente las poblaciones silvestres han tenido una disminución drástica debido a la presión antropogénica, a un inadecuado manejo de los recursos naturales y a la pérdida del hábitat (González-Jara *et al.*, 2011). La cosecha de Chiltepín es una práctica económica de importancia para las poblaciones rurales. Representa una actividad estacional para niños, jóvenes, mujeres y adultos mayores (Bañuelos *et al.*, 2008). Este chile es empleado en la preparación de una gran variedad de platillos regionales, siendo un condimento fundamental en la gastronomía nacional. También representa un elemento característico de la medicina tradicional mexicana para tratar ciertos padecimientos, por ejemplo, dolores de garganta, indigestión, acidez estomacal, dolor de oído, reumatismo, resfriados, tos común, gastritis y úlceras (Nabhan *et al.*, 1990; Bañuelos *et al.*, 2008).

Los usos y preferencias varían según la región; así mismo en el territorio nacional existen una gran cantidad de nombres comunes para este cultivo, entre ellos están: chiltepín (Sonora), chile de monte, piquín, quipin (Querétaro), chiltepec, chiltepillito, chilpaya, pico de pájaro, mosquito, bolita, diente de tlacuache, pulga, timpinchile, simojovel (Chiapas), amashito (Tabasco), amomo, enano, tichusni (Oaxaca), max (Yucatán). En otros países esta variedad es conocida como: chiltepe (Guatemala), ají (Colombia), turkey pepper, bird pepper, American bird pepper, chiltepin pepper, pinhead pepper, cayenne pepper (USA), chilillo pequeño, guindilla (España), iao mi la (China), piment des oiseaux (Francia) y ot hiem (Vietnam) (Guzmán *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2008; Araiza *et al.*, 2011).

#### 2.4.7 Estudios previos

La combinación de datos fenotípicos, geográficos y moleculares del chile Chiltepín pueden proveer información para evaluar su diversidad genética. El estudio de los niveles y patrones de dicha diversidad facilita la identificación de poblaciones clave para el desarrollo de programas de mejoramiento genético (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Se han realizado estudios de caracterización de chile Chiltepín con el fin de evaluar su diversidad genética y las relaciones entre poblaciones de distintas regiones usando sistemas enzimáticos y marcadores moleculares basados en PCR. El primero de estos análisis se llevó a cabo mediante nueve isoenzimas y 192 accesiones pertenecientes al género *Capsicum*, 69 de ellas silvestres y 12 provenientes de Costa Rica, Perú y Nuevo México. Las muestras fueron agrupadas en las categorías: domesticadas, semi-domesticadas y silvestres, en las cuales se identificaron niveles bajos de heterocigosidad esperada ( $H_s=0.012$ ,  $H_s=0.007$  y  $H_s=0.025$ , respectivamente) (Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989).

Dicho estudio contrasta con el realizado por Hernández-Verdugo (2001) el cual se basó en 12 loci polimórficos de nueve isoenzimas. Se describe una variación genética alta, tanto en especies silvestres ( $H_e = 0.445$ ) y semi-domesticadas (0.461) como en domesticadas ( $H_e = 0.408$ ).

Un estudio de diversidad nucleotídica de secuencias de tres loci nucleares (Dhn, G3pdh, y Waxy) reporta una reducción del 10 al 17 % en la diversidad de chiles cultivados respecto a los silvestres (Aguilar-Mélendez *et al.*, 2009). También sugiere al estado de Yucatán como un centro importante de diversidad. Además, concluyen que la diversidad genética presentó una clara relación con la localización geográfica, del mismo modo que se describió anteriormente en las poblaciones de chile Chiltepín del noreste y el noroeste de México. La diferenciación genética se correlacionó con el aislamiento geográfico debido a que se encuentran separadas por la Meseta Central Mexicana (Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989).

La diversidad genética de poblaciones de Arizona, el norte de México y Guatemala se evaluó mediante marcadores RAPDs (Votava *et al.*, 2002). No se encontraron diferencias

entre las accesiones de Arizona; las muestras de Sonora y Chihuahua fueron consideradas diversas, sin embargo, la mayor variabilidad fue hallada en Guatemala.

Posteriormente 74 poblaciones de Guatemala pertenecientes a distintas especies del género *Capsicum* (*C. annuum* L. var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. pubescens*, *C. chinense*, y *C. frutescens*) fueron evaluadas con marcadores AFLP. Mediante un análisis de coordenadas principales en 82 % de las accesiones de la variedad *glabriusculum* se agruparon juntas. Los resultados también sugieren la existencia de flujo génico entre *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. annuum* L. var. *annuum*, y *C. annuum* L. var. *glabriusculum* (Guzmán *et al.*, 2005).

En otro estudio en el cual se buscaba determinar el efecto del manejo sobre la variación genética de poblaciones de Chiltepín silvestres, semi-cultivadas y cultivadas, se seleccionaron nueve marcadores microsatélite. La mayor variabilidad se detectó entre las poblaciones provenientes del estado de Yucatán, el cual ha sido considerado un centro de diversidad de este cultivo, coincidiendo con los resultados de Aguilar-Mélendez *et al.* (2009). La variabilidad más baja se registró entre las poblaciones procedentes del Estado de Sonora. Así mismo se plantea que a pesar de que no existen diferencias fenotípicas marcadas entre las poblaciones cultivadas y silvestres, el decremento de la variación genética entre las primeras, es significativo (González-Jara *et al.*, 2011).

En el año 2014 se llevó a cabo la secuenciación del genoma del Chiltepín utilizando la plataforma Illumina; el tamaño estimado fue de 3.07 Gb. Las semillas para la realización de este estudio fueron colectadas en el estado de Querétaro. El número de genes que codifican proteínas fue de 34,476. El 81.4 % del genoma del Chiltepín está compuesto por elementos transponibles y el 70.1 % corresponde a retrotransposones del tipo LTR, los cuales contribuyen a la expansión del genoma (Qin *et al.*, 2014).

## LITERATURA CITADA

- Abadie, T., y Berretta, A. (2010). Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. En: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (Ed.), *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del cono sur*. San José (pp. 91-100) Montevideo, Uruguay: Procisur.
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P.L., Roose, M.L., and Kim, S.C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190–1202. doi: 10.3732/ajb.0800155
- Araiza L. N., Araiza L. E., y Martínez M. J. G. (2011). Evaluación de la germinación y crecimiento de plántula de chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) en invernadero. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13, 170-175. doi: 10.15446/rev.colomb.biote
- Bañuelos, N., Salido, P. L., y Gardea, A. (2008). Etnobotánica del Chiltepín. Pequeño gran señor de la cultura de los sonorenses. *Estudios sociales*, 16(32), 177-205. ISSN: 0188-4557 <http://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v16n32/v16n32a6.pdf>
- Barrera-Saldaña, H. A., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A., y Reséndez-Pérez, D. (1993). Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*, 18(108), 50-60. ISSN: 0185-0008 <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-desarrollo/articulo/reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-una-nueva-epoca-dorada-en-la-biologia-molecular>
- Brown, A. H. D. (1979). Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Population Biology*, 15, 1-42. doi: 10.1016/0040-5809(79)90025-X
- Brown, A. H. D. (2000). The genetic structure of crop landraces and the challenge to conserve them *in situ* on farms. In: S. B. Brush. (Ed.), *Genes in the Field. On-Farm Conservation of Crop Diversity* (pp. 29-48). Boca Raton, USA: CRC Press (Lewis Publishers).
- Brush, S. B. (2000). The issues of *in situ* conservation of crop genetic resources. In: S. B. Brush. (Ed.), *Genes in the Field. On-Farm Conservation of Crop Diversity* (pp. 3-26). Boca Raton, USA: CRC Press (Lewis Publishers).
- Cariello, N. F., Swenberg, J. A., and Skopek, T. R. (1991). Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 19(15), 4193-4198. doi: 10.1093/nar/19.15.4193
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Pérez-Negrón, E., and Valiente-Banuet, A. (2007). *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Annals of Botany*, 100, 1101-1115. doi: 10.1093/aob/mcm126

- Charafi, J., Meziane, A., Moukhli, A., Boulouha, B., Modafar, C. and Khadari, B. (2008). Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 893–900. doi: 10.1007/s10722-007-9294-6
- Chen, F., and Bradford, K. J. (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology*, 124, 1265-1274. doi: 10.1104/pp.124.3.1265
- Culley, T., and Wolfe, A. (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86, 545-556. doi: 10.1086/50266
- Donald, P. F. (2004). Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conservation Biology*, 18, 17-37. doi: 10.1111/j.1523-1739.2004.01803.x
- Eguiarte, L. E., Souza, V., y Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular*. Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Ecología (INE), Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) 592 p.
- FAO. (2010). *Segundo Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo*. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome, Italy 372 p.
- Ford-Lloyd, B., and Jackson, M. (1986). *Plant genetic resources. An introduction to their conservation and use*. Baltimore, USA: Edward Arnold. doi: 10.1016/0168-9525(87)90181-8
- Franco, T. L., e Hidalgo, R. (2003). *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Boletín técnico no. 8. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) 89 p.
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews*, 24, 1-44. doi: 10.1002/9780470650288.ch1
- Godwin, I. D., Aitken, E. A. B. and Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524-1528. doi: 10.1002/elps.1150180906
- González-Andrés, F. (2001). La caracterización vegetal: Objetivos y enfoques. En: F. González-Andrés y J. M. Pita Villamil. (Eds.), *Conservación y caracterización de recursos filogenéticos* (pp. 189-198). Valladolid, España: Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola.
- González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., and García-Arenal, F. (2011). Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. *PLoS ONE*, 6(12), e28715. doi: 10.1371/journal.pone.0028715

- Guzmán, F. A., Ayala, H., Azurdia, C., Duque, M. C., and de Vicente, M. C. (2005). AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala. *Crop Science*, 45, 363–370. doi: 10.2135/cropsci2005.0363
- Hajeer, A., Worthington, J., and John, S. (2000). SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. In: *Biotechniques: Molecular laboratory methods series*. Manchester, UK: Eaton Publishing. 120 p.
- Hammer, K., Arrowsmith, N., y Glasdis, T. (2003). Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften*, 90(6), 241–250. doi: 10.1007/s00114-003-0433-4
- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., and Medina-Juárez, L. A. (2016). Wild Pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, Plant Morphology, Distribution, Genetic Diversity, Genome Sequencing, and Phytochemical Compounds. *Crop Science*, 56(1), 1-11. doi:10.2135/cropsci2014.11.0789
- Heiser, C. B., and Pickersgill, B. (1975). Names for the bird peppers (*Capsicum-Solanaceae*). *Baileya*, 19, 151–153. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302764914>
- Hernández-Verdugo, S., Dávila, A. P., y Oyama, K. (1999). Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 64, 65-84. doi: 10.17129/botsoci.1583
- Hernández-Verdugo, S., Luna-Reyes, R., and Oyama, K. (2001). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Systematics and evolution*, 226(3-4), 129-142. doi: 10.1007/s006060170061
- Hidalgo, R. (2003). Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: T.L. Franco y R. Hidalgo (Eds.), *Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos*. *Boletín Técnico Núm. 8*: 2-26. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos.
- Kantely, R. V., Zeng, X. P., Bennetzen, J. L. and Zehr, B. E. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequences. *Molecular breeding*, 1, 365-373. doi: 10.1007/BF01248414
- Karp, A., and Edwards, K. J. (1998). DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollé's, and P. M. Gresshoff (Eds.), *DNA markers: protocols, applications and overviews* (pp. 1-13). Wiley, New York: J. Wiley & Sons.
- Kessler, J. J., Rood, T., Tekelenburg, T., and Bakkenes, M. (2007). Biodiversity and socioeconomic impacts of selected agro-commodity production systems. *The Journal of Environment & Development*, 16(2), 131-160. doi: 10.1177/1070496507302516
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., y Palladino, M. A. (2013). *Conceptos de Genética*. 10ª edición. Madrid, España: Pearson Educación 992 p.

- Kraft, K. H., Brown C.H., Nabhan, G.P., Luedeling, E., Luna Ruiz, J. de J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Hijmans, R. J. and Gepts, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6165–6170. doi: 10.1073/pnas.1308933111
- Krebs, J. E., Lewin, B., Goldstein, E. S., and Kilpatrick, S. T. (2018). *Lewin's genes XII*. Massachusetts, USA: Jones & Bartlett Learning 892 p.
- Kuriachan, P. (1981). A cytogenetic study of the wild and cultivated varieties of *Capsicum baccatum* L. *Indian Journal of Botanical Research*, 4, 27-32. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301333585>
- Laborde, J. A. y Pozo, C. O. (1982). *Presente y pasado del chile en México*. Ciudad de México, México: Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México 80 p.
- Lanteri, S. (1991). Lack of a karyotype class and skewed chromosome segregation in two backcross progenies of *Capsicum*. *Journal Genetic and Breeding*, 45, 51-58. NAID: 10030434380 <https://ci.nii.ac.jp/naid/10030434380/>
- Loaiza-Figueroa, F., Ritland, K., Cancino, J. A. L., and Tanksley, S. D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 165(3-4), 159-188. doi: 10.1007/BF00936000
- Long-Solís, J. (1988). *Capsicum y cultura: La historia del Chilli*. Ciudad de México, México: Fondo de Cultura Económica 203 p.
- Lowe, A., Harris, S., and Ashton, P. (2004). *Ecological Genetics. Design, Analysis, and Application*. Oxford, Uk: Balkwell Publishing 344 p.
- Markert, C. L., and Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45, 753-763. doi: 10.1073/pnas.45.5.753
- Medina, T., Rodríguez Del Bosque, L. A., Villalón, H., Pozo, O., Ramírez, M., López, R., Lara, M., Gaona, G., Cardona, A., y Mora, A. (2002). El chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) en el Noreste de México. Aspectos ecológicos y socioeconómicos. *Biotam nueva serie*, 13, 1-14.
- Meyer, S. E., Allen, P. S., and Beckstead, J. (1997). Seed germination regulation in *Bromus tectorum* (Poaceae) and its ecological significance. *Oikos*, 78, 474-485. doi: 10.2307/3545609
- Mohammadi, S. A., and Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants - Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235–1248. doi: 10.2135/cropsci2003.1235
- Molina, C., Morales, A., y Marquez, A. (2009). *Técnicas para el establecimiento y producción de chiltepín silvestre, bajo un sistema agroforestal en Sonora, México. Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill. Jalisco, México: CONAFOR, ITVY, INIFAP 38 p.

- Montes, H. S. (2010). *Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género Capsicum que crecen y se cultivan en México. Informe final*. Campo Experimental Bajío, Celaya, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) 84 p.
- Montes, H. S., Ramírez, M. M., Villalón, M. H., Medina, M. T., Morales, C. A., Heredia, G. E., Soto, R. J. M., López, L. R., Cardona, E. A., y Martínez, T. H. L. (2006). Conservación y aprovechamiento sostenible de chile silvestre (*Capsicum* spp. Solanaceae) en México. En: L. P. López y H. S. Montes. (Eds.), *Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. INIFAP-CIR-CENTRO* (pp. 71-134). Libro científico. Núm. 1. Celaya, Guanajuato, México.
- Moscone, E. A., Scaldaferrro, M. A., Grabiele, M., and Cecchini, N.M. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulturae*, 745, 137-169. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.745.5
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56
- Nabhan, G. P. (1985). *Gathering the desert*. Tucson, USA: The University of Arizona Press 221 p.
- Nabhan, G. P., Slater, M., and Yarger, L. (1990). New crops small farmers in marginal lands? Wild chiles as a case study. In: M.A. Altieri and S.B. Hecht. (Eds.), *Agroecology and small farm development* (pp. 19-34). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Pascual, U., and Perrings, C. (2007). Developing incentives and economic mechanisms for *in situ* biodiversity conservation in agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121(3), 256- 268. doi: 10.1016/j.agee.2006.12.025
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., and Holst, I. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315, 986-988. doi: 10.1126/science.1136914
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96, 129-133. doi: 10.1023/A:1002913228101
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany*, 100, 925-940. doi: 10.1093/aob/mcm193
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casas, A., Castañeda-Sortibrán, A., Castillo, A., Cerritos, R., Chassin-Noria, O., Colunga-GarcíaMarín, P., Delgado, P., Díaz-Jaimes, P., Eguiarte, L. E., Escalante, A. E., Espinoza, B., Fleury, A., Flores, R. S., Fragoso G., González-Astorga, J., Islas, V. V., Martínez, E., Martínez, F., Martínez-Castillo, J., Mastretta, Y. A., Medellín, R., Medrano-González, L., Molina-Freaner, F., Morales, V. B., Murguía, V. A., Payró de la Cruz, E., Reyes-Montes, M., Robles, S. M., Rodríguez-Arellanes, G., Rojas, B. L., Romero-Martínez, R., Sahaza-Cardona, J., Salas, L. R., Sciutto, E., Scott, B. C., Schramm, U. Y., Silva, C., Souza, V., Taylor, M., Urbán, R. J., Uribe-Alcocer,

- M., Vázquez, C. M., Vázquez-Domínguez, E., Vovides, A. P., Wegier, A., Zaldívar-Riverón, A., Zúñiga, G. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En: J. Soberón, G. Halffter y J. Llorente-Bousquets. (Eds.), *Capital natural de México. Volumen 1: Conocimiento actual de la Biodiversidad* (pp. 437-494). Ciudad de México, México: CONABIO.
- Pomp, D., and Medrano, J. F. (1991). Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 10(1), 58-59. PMID: 2003924 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003924>
- Powell, W. (1992). Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In: J. P. Moss. (Ed.), *Biotechnology and crop improvement in Asia*. (pp. 297-322). Patancheru, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., Cheng, J., Zhao, S., Xu, M., Luo, Y., Yang, Y., Wu, Z., Mao, L., Wu, H., Ling-Hu, C., Zhou, H., Lin, H., González-Morales, S., Trejo-Saavedra, D. L., and Tian, H. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5135–5140. doi: 10.1073/pnas.1400975111
- Rao, R. V., and Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68, 1-19. doi: 10.1023/A:1013359015812
- Rodríguez del Bosque, L. A. (2005). Preferencia del consumidor por el chile piquín en comparación con otros chiles del Noroeste de México. *Revista Chapingo serie Horticultura*, 11(2), 279-281. doi:10.5154/r.rchsh.2004.06.029
- Rodríguez del Bosque, L. A., Ramírez-Meraz, M., y Pozo-Campodonico, O. (2004). *Tecnología de producción de chile piquín en el noreste de México. Folleto técnico Núm. 29*. Río Bravo, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) 33 p.
- Romero-da Cruz, M. V., Urdampilleta, J. D., Forni Martins, E. R., and Moscone, E. A. (2017). Cytogenetic markers for the characterization of *Capsicum annuum* L. cultivars. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151(1), 84-91. doi: 10.1080/11263504.2015.1103798
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. doi: 10.1126/science.239.4839.487
- SAGARPA. (2016). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: *Boletín informativo*. Ciudad de México, México. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGENE052017.aspx#>

- Sevilla, R., y Holle, M. (2004). *Recursos Genéticos Vegetales*. Lima, Perú: Torre Azul. pp 223-242.
- SIAP. (2010). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Información Agroalimentaria y Pesquera: Un panorama del cultivo del chile. <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
- Singh, B. D., and Singh, A. K. (2015). *Marker-assisted plant breeding: principles and practices*. New Delhi, India: Springer 514 pp.
- Singh, R. K., Mishra, G. P., Thakur, A. K., and Singh, S. B. (2008). Molecular markers in plants. In: R. K. Singh, R. Singh, G. Ye, A. Selvi, and G. P. Rao. (Eds.), *Molecular plant breeding: principle, method and application*. (pp. 35-78). Texas, USA: Studium Press LLC.
- Staub, J. E., Serquen, F. C., and Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729-741. doi:10.21273/hortsci.31.5.729
- Tanksley, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 3-8. doi: 10.3923/pjbs.2002.1141.1147
- Templeton, N. S. (1992). The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagnostic Molecular Pathology*, 1(1), 58-72. doi: 10.1097/00019606-199203000-00008
- Teodoro-Pardo, C. V. D., García-Velázquez, A., y Corona-Torres, T. (2007). Polimorfismo cromosómico en *Capsicum annuum* (Solanaceae) en recolectas de Puebla, Morelos y Querétaro, México. *Agrociencia*, 41(8), 873-881. ISSN: 1405-3195 <http://www.redalyc.org/pdf/302/30220203007.pdf>
- Thul, S. T., Darokar, M. P., Shasany, A. K., and Khanuja, S. P. (2012). Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. *Molecular Biotechnology*, 51(2), 137-147. doi: 10.1007/s12033-011-9446-y
- Valadéz, E., y Kahl, G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Texcoco, México: Mundi-Prensa, México, S. A. de C. V. Universidad Autónoma de Chapingo 147 p.
- Votava, E. J., Nabhan, G.P., and Bosland, P. W. (2002). Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an *in situ* population and *ex situ* accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics*, 3(2), 123–129. doi: 10.1023/A:1015216504565
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., and Bovy, A. G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of Natural Products*, 76(4), 783–793. doi: 10.1021/np300898z
- Wiersema, J. H., and León, B. (1999). *World economic plants: A standard reference*. Boca Ratón, USA: CRC Press 792 p.

- Wolfe, A., Xiang, Q. Y., and Kephar, S. R. (1998). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology*, 7(9), 1107–1125. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00425.x
- Yang, W. P., De Oliveira, A. C., Godwin, I., Schertz, K., and Bennetzen, J. L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Science*, 36, 1669-1676. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600060042x}
- Zhigila, D. A., AbdulRahaman, A. A., Kolawole, O. S., and Oladele, F. A. (2014). Fruit morphology as taxonomic features in five varieties of *Capsicum annum* L. Solanaceae. *Journal of Botany*, 2014, 1–6. doi: 10.1155/2014/540868
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183. doi: 10.1006/geno.1994.1151}

## CAPÍTULO III

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y APROXIMACIÓN ETNOBOTÁNICA DEL CHILE CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) DE LA VERTIENTE ORIENTAL DE MÉXICO

#### RESUMEN

La diversidad genética es el resultado de largos procesos de selección y recombinación de genes, en los cuales la mutación, la hibridación y la migración constituyen las principales fuentes de variación. La conservación del acervo genético vegetal, es esencial para preservar atributos o características de interés, así como disponer de genes de importancia para el fitomejoramiento. El uso de germoplasma silvestre, es una alternativa viable frente a la pérdida de diversidad en plantas cultivadas. El chile Chiltepín es considerado el ancestro silvestre de las formas cultivadas de chile. Su fruto es altamente cotizado y se obtiene por recolección en poblaciones naturales. La principal limitante para su explotación comercial es la tasa de germinación que suele ser inferior al 5 %. En el presente estudio se exploró la variabilidad genética de 70 colectas de chile Chiltepín de la vertiente oriental mexicana, mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR. Adicionalmente se obtuvo información etnobotánica sobre conocimiento local, manejo y usos por medio de la aplicación de encuestas. El uso de diez iniciadores ISSR generó 134 bandas polimórficas. Se calcularon las distancias de Dice entre colectas y se realizó un análisis de agrupamiento con el método UPGMA, obteniéndose la formación de cinco grupos, los cuales se relacionaron con proximidad geográfica, rango altitudinal y apariencia de frutos. La mayor parte de la variabilidad genética en esta especie, se concentra al interior de las poblaciones, siendo la región Huasteca la más diversa. Con 31 variables etnobotánicas se llevó a cabo un análisis de correspondencia múltiple, con un 60.31 % de varianza acumulada en las primeras dos dimensiones. Las variables de mayor influencia fueron: destino y estado del producto, cantidad que se recolecta para venta, sitio de entrevista, precio por kilogramo, integrantes que se encargan de la venta, época de recolección y sitios de comercialización.

**Palabras clave:** Chile silvestre, diversidad genética, marcadores moleculares, ISSR.

---

<sup>1</sup>Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.  
Autora: Biol. Rebeca Hernández Peña  
Director de Tesis: Dr. Juan Martínez Solís

# MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ETHNOBOTANICAL APPROACHMENT OF WILD CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) OF THE EASTERN SLOPE OF MEXICO<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The genetic diversity is the result of long processes of gene selection and recombination, in which mutation, hybridization and migration are the main sources of variation. The conservation of the vegetal gene pool is essential to preserve attributes or characteristics of interest, as well as to have genes of importance for plant breeding. The use of wild germplasm is a viable alternative to the loss of diversity in cultivated plants. The Chiltepín pepper is considered the wild ancestor of the cultivated forms of chili. Its fruit is highly valued and it is obtained from harvesting in natural populations. The main limitation for commercial exploitation is the low germination rate, which is usually less than 5 %. In the present study, the genetic variability of 70 collections of Chiltepín pepper from the eastern Mexican slope was explored through the use of ISSR molecular markers. Additionally, ethnobotanical information on local knowledge, management and uses was obtained through surveys. The use of ten ISSR primers generated 134 polymorphic bands. The Dice distances among collections were calculated and a clustering analysis was performed with the UPGMA method, obtaining the formation of five groups, which were related to the geographical proximity, altitudinal range and appearance of the fruits. Most of the genetic variability in this species is concentrated within the populations, being the Huasteca region the most diverse. A multiple correspondence analysis with 31 ethnobotanical variables was carried out with an accumulative variance of 60.31 % in the first two dimensions. The variables of greatest influence were: the destination and condition of the product, the amount collected for sale, the interview site, the price per kilogram, the members who are responsible for the sale, the time of collection and the marketing sites.

**Key words:** Chiltepin wild pepper, genetic diversity, molecular markers, ISSR

---

<sup>2</sup>Thesis of Horticultural Sciences MSc program, Universidad Autónoma Chapingo.  
Author: Biol. Rebeca Hernández Peña  
Advisor: Dr. Juan Martínez Solís

## INTRODUCCIÓN

El chile Chiltepín es considerado el progenitor silvestre de la especie *C. annuum* y un importante recurso genético para el mejoramiento de los chiles cultivados (Pickersgill, 1997; Aguilar Meléndez *et al.*, 2009). Se distribuye desde el Norte de Perú, Colombia, América Central, México y el Suroeste de Estados Unidos (Arizona, Nuevo México y Texas) (Hernández-Verdugo *et al.*, 1999; Votava *et al.*, 2002). Particularmente en México se encuentra a lo largo de la costa del Pacífico desde Sonora hasta Chiapas y alrededor de la península de Yucatán y el Golfo de México, además en los estados de Baja California, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla (Medina *et al.*, 2002; González-Jara *et al.*, 2011). Es un arbusto perenne de reproducción autógama que presenta elevada plasticidad fenotípica en cuanto a la morfología de las hojas, la forma del fruto, los patrones de germinación y de resistencia a patógenos (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001). Su fruto es rico en compuestos fenólicos y flavonoides con capacidades antioxidantes como luteolina, catequina y resveratrol, además es fuente de capsaicinoides, capsinoides, carotenoides, tocoferoles (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y compuestos volátiles (Wahyuni *et al.*, 2013; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Es muy apreciado y cotizado debido a su grado de pungencia y a que posee propiedades que no irritan el sistema digestivo. En México es considerado el segundo chile más picoso (100,000-200,000 unidades Scoville), tan sólo después del Habanero (*C. chinense*; 100,000 to 445,000 US) (SIAP, 2010).

La principal limitante para la explotación comercial del chile Chiltepín es la latencia de la semilla, lo cual ocasiona una baja germinación que, en el medio natural, suele ser inferior al 5% (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004). Esto se atribuye a la impermeabilidad y dureza de la cubierta seminal, a la baja permeabilidad del endospermo y a una latencia profunda en la que se encuentra el embrión (Bañuelos *et al.*, 2008; Araiza *et al.*, 2011). En consecuencia, el mayor volumen comercializado se obtiene por recolección en poblaciones silvestres, lo cual ha provocado un decremento de hasta el 50% de la diversidad genética debido a factores como fragmentación del hábitat, fluctuaciones climáticas y el efecto de ciertas presiones antropogénicas como la sobreexplotación (González-Jara *et al.*, 2011).

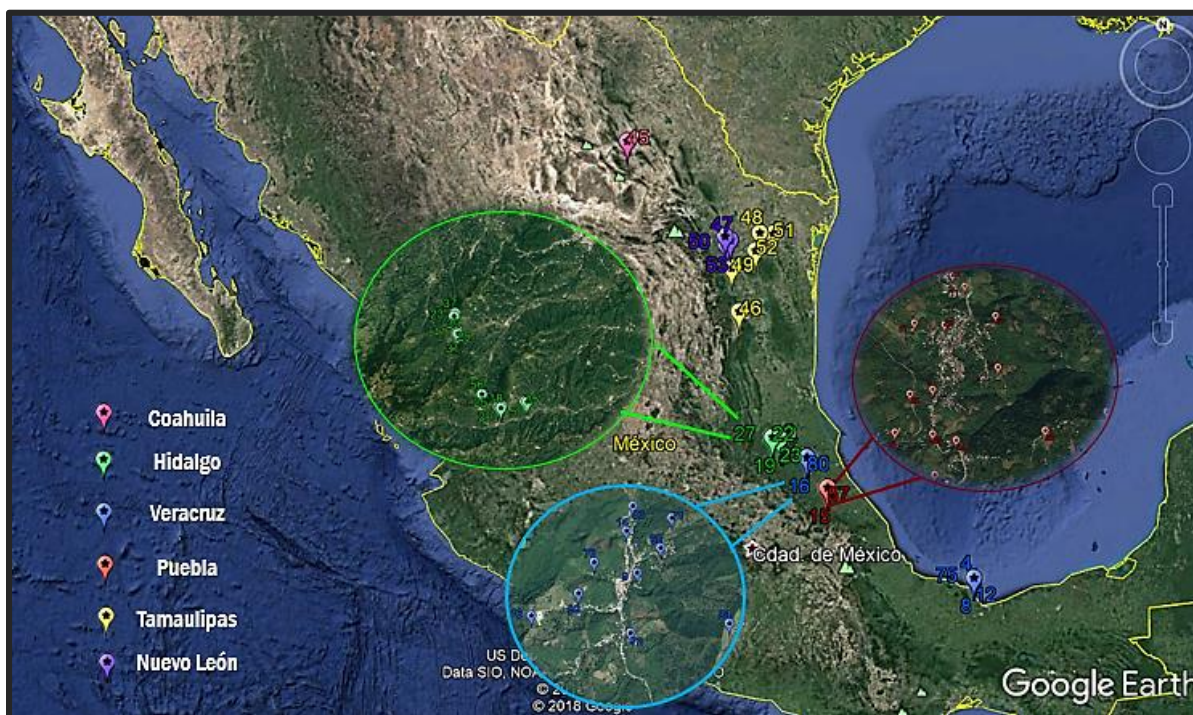
La cosecha de chile Chiltepín es una práctica estacional de relevancia económica para las comunidades rurales. Es un elemento icónico de la gastronomía y la cultura nacional. También se utiliza medicina tradicional para tratar padecimientos como dolores de garganta, indigestión, acidez estomacal, dolor de oído, reumatismo, resfriados, tos común, gastritis y úlceras (Nabhan *et al.*, 1990; Bañuelos *et al.*, 2008).

El alto grado de aceptación que tienen los chiles silvestres ha contribuido a que exista una demanda constante y creciente por este producto haciendo evidente la falta de estrategias de producción. La caracterización y evaluación de la diversidad presente en colecciones vegetales silvestres, es central en el mantenimiento y mejora de la agricultura moderna ya que constituyen una alternativa viable. Su conocimiento permite llevar a cabo un uso, explotación y conservación racionales. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue explorar la variabilidad genética de colectas de chile Chiltepín provenientes de la vertiente oriental de México, así como obtener información etnobotánica sobre el conocimiento local, manejo y usos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Colecta del material vegetal

En el presente estudio se evaluaron 70 poblaciones de chile Chiltepín (*Capsicum annum* L. var *glabriusculum*), provenientes de la vertiente oriental de México, que comprende los estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila (Figura 5). Se llevó a cabo una colecta de frutos maduros durante los años 2017 y 2018. Cada población fue considerada como una unidad básica de caracterización (UBC).



**Figura 5.** Mapa de sitios geográficos de colecta de frutos y semillas de chile Chiltepín de la vertiente oriental mexicana.

Las localidades fueron georreferenciadas (Apéndice 1). Los frutos obtenidos se secaron a temperatura ambiente ( $\approx 18^\circ\text{C}$ ) y posteriormente se extrajeron las semillas, las cuales fueron separadas y etiquetadas de acuerdo a su sitio de recolección.

### 2. Tratamiento pre-germinativo

Para uniformizar la germinación, las semillas colectadas fueron sumergidas en ácido giberélico a una concentración de  $5\text{ gL}^{-1}$  durante 24 horas. Posteriormente, fueron sembradas en charolas de poliestireno de 200 cavidades conteniendo como sustrato una

mezcla de Peat Moss y Agrolita (3:1). Estas se mantuvieron en una cámara de germinación a una temperatura de 30 °C bajo obscuridad hasta la emergencia de las plántulas.

### **3. Caracterización molecular**

Debido a los problemas de germinación comunes en esta especie, en el caso de las UBDs 3 a la 53, el ADN fue extraído directamente de las semillas, para lo cual se empleó 1 gramo por población; mientras que en las UBCs restantes, de la 55 a la 84, el ADN se purificó a partir de hojas jóvenes, limpias y sanas, usando 1 gramo de peso fresco. Ambos tipos de material vegetal fueron previamente lavados con alcohol al 70 %.

**3.1 Extracción y purificación de ADN mediante el método CTAB.** Un gramo de tejido por cada UBC se colocó en un mortero al cual se le añadió nitrógeno líquido para macerar con un pistilo hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido con una espátula metálica a un tubo Eppendorf de 1.5 mL que contenía 700 µL de amortiguador de extracción precalentado (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 2-Mercaptoetanol (0.2 %), CTAB (2 %), pH 8.0). Después, se agitaron las muestras por inversión hasta homogenizar la mezcla, se calentaron a 65 °C durante 20 minutos, se agregaron 200 µL de acetato de potasio 5 M y se colocaron en baño de hielo por 45 minutos; posteriormente se centrifugaron por 20 minutos a 21,000 xg y el sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mantuvieron en agitación continua dos minutos.

Se realizó una segunda centrifugación a 12,000 xg por cinco minutos, la fase acuosa superior fue separada y colocada en un nuevo tubo Eppendorf con 500 µL de isopropanol frío. Cada muestra fue agitada por inversión para obtener el precipitado de ácidos nucleicos en forma de una nube blanquecina tenue. Los tubos se mantuvieron a -20 °C durante 50 minutos y luego fueron centrifugados a 16,000 xg por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante reteniendo la pastilla en el fondo y se agregaron 700 µL de STE (pH 8), conservando las muestras en un refrigerador a 4 °C.

Una vez que el ADN se disolvió, se agregaron 4 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por dos horas. El material genético fue reprecipitado mediante la adición de 70 µL de acetato de sodio 3 M y 700 µL de isopropanol frío agitando por inversión. Las

muestras se colocaron a -20 °C por 30 minutos y después fueron centrifugadas a 8,000 xg por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN fue lavada con 500 µL de etanol al 70 % (grado reactivo) para disolver sales. Posteriormente, los tubos Eppendorf se centrifugaron a 8,000 xg por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se secaron los residuos utilizando un Termoblock. Finalmente, la pastilla seca fue disuelta en 100 µL de TE (pH 8). Las muestras fueron almacenadas a 4 °C.

**3.2 Cuantificación y cualificación de ADN.** La cuantificación de ADN se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1,000 (Thermo Fisher Scientific, ds DNA Factor: 50), a partir de 3 µL de cada muestra. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 260 nm y se registró la concentración estimada en ng µL<sup>-1</sup> así como la relación 260/280, la cual es un parámetro de pureza que se mide en la siguiente escala:

**Cuadro 3.** Intervalo de valores de la relación 260/280 ( $\lambda$ ) indicador de la pureza del ADN aislado.

| Valor ( $\lambda$ ) | Pureza                                            |
|---------------------|---------------------------------------------------|
| 1.8 – 2             | ADN con pureza óptima                             |
| 1.6 – 1.8           | ADN con pureza aceptable                          |
| < 1.6               | Presencia de compuestos aromáticos                |
| > 2.1               | Contaminación por ARN                             |
| < 1.5               | Contaminación por sales, carbohidratos y fenoles. |

Una vez obtenidas las mediciones se realizaron las diluciones necesarias para llevar cada una de las muestras a una concentración final de 10 ng µL<sup>-1</sup> utilizando la siguiente expresión:

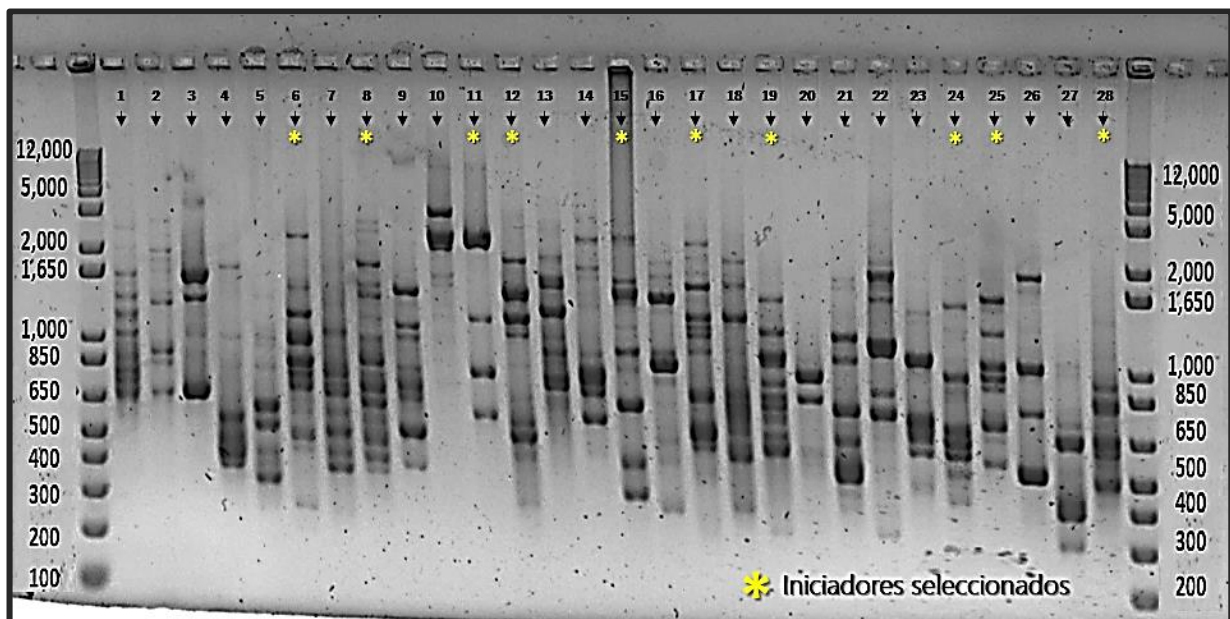
$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} \quad V_1 = \frac{(10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1})(100 \mu\text{L})}{C_1}$$

Para verificar la calidad e integridad del material genético purificado, se empleó un gel de agarosa al 0.8 % adicionado con amortiguador TAE 1X. Después de la gelificación

térmica, en cada pozo se cargaron 8  $\mu\text{L}$  de ADN mezclado con una gota de amortiguador de carga, el cual aumenta la densidad de la muestra y permite su visualización.

Después de cargar todos los pozos se procedió a realizar la electroforesis por una hora, utilizando una fuente de poder a 150 V y como amortiguador de corrimiento TAE 0.25X. Al término de la misma el gel se sometió a tinción durante 20 minutos con bromuro de etidio ( $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para fotodocumentar, el gel de agarosa se transfirió a un transiluminador de luz UV y se capturó la imagen.

**3.3 Obtención de patrones tipo ISSR.** En un ensayo previo se probaron 28 iniciadores (Sigma®), de los cuales se seleccionaron los 10 que produjeron bandas claras y bien definidas (Figura 6). Nueve de ellos estuvieron anclados al extremo 3' y uno (PHV 6) al extremo 5' (Cuadro 4).



**Figura 6.** Patrones de bandeo generados en la prueba de 28 iniciadores ISSR (Sigma®). Carriles: 1→ ISSR 1; 2→ ISSR 2; 3 → ISSR 5; 4→ ISSR 7; 5→ PI 01; 6→ PHV 6; 7→ PHV 7; 8→ ISSR 3; 9→ ISSR 4; 10→ ISSR 6; 11→ PI 04; 12→ LOL 8; 13→ ISSR 8; 14→ LOL 2; 15→ PI 02; 16→ PI 03; 17→ MESL 2; 18→ MESL 3; 19→ ISSR 9; 20→ ISSR 10; 21→ LOL 7; 22→ MESL 1; 23→ Echt 5; 24→ 17899 A; 25→ 17898 B; 26→ LOL 9; 27→ LOL 10; 28→LOL 12. Marcador de peso molecular (1 Kb) a ambos extremos.

**Cuadro 4.** Iniciadores seleccionados, secuencia y temperatura de alineamiento para la obtención de los perfiles ISSR.

|           | <b>Iniciador</b> | <b>Secuencia<br/>(5'→ 3')</b> | <b>Temperatura de<br/>alineamiento (°C)</b> |
|-----------|------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>1</b>  | ISSR 9           | (AG) <sub>8</sub> C           | 50                                          |
| <b>2</b>  | ISSR 3           | (GA) <sub>8</sub> CTC         | 58                                          |
| <b>3</b>  | MESL 2           | (GA) <sub>6</sub> GG          | 56                                          |
| <b>4</b>  | 17898 B          | (CA) <sub>6</sub> GT          | 48                                          |
| <b>5</b>  | PI 02            | (CA) <sub>6</sub> AGG         | 56                                          |
| <b>6</b>  | LOL 8            | (GT) <sub>6</sub> CC          | 56                                          |
| <b>7</b>  | 17899 A          | (CA) <sub>6</sub> AG          | 48                                          |
| <b>8</b>  | PHV 6            | CCA(CT) <sub>8</sub>          | 60                                          |
| <b>9</b>  | LOL 12           | (GTG) <sub>3</sub> GC         | 48                                          |
| <b>10</b> | PI 04            | (CT) <sub>8</sub> AGC         | 58                                          |

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cada uno de los iniciadores anteriormente seleccionados, se llevó a cabo el siguiente protocolo. En dos tubos Eppendorf de 1.5 mL se preparó una mezcla de reacción total (Cuadro 5), la cual fue posteriormente alicuotada para obtener para cada una de las 70 muestras un volumen final de 25 µL; adicionalmente se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos a excepción de ADN molde. Durante todo el proceso los tubos de PCR se mantuvieron en frío para evitar la desnaturalización de la enzima.

Una vez que se colocaron todos los componentes en los tubos individuales, éstos fueron transferidos a una placa del termociclador Veriti (96 Well Applied Biosystems®), el cual fue programado como se indica en el Cuadro 6.

**Cuadro 5.** Componentes y sus concentraciones en la mezcla de reacción para PCR con un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

| Reactivo          | [Inicial]                | [Final]           | $\mu\text{L}$ (1X) |
|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| H <sub>2</sub> O  | –                        | –                 | 5.2                |
| dNTP's            | 500 $\mu\text{M}$ c/u    | 200 $\mu\text{M}$ | 10                 |
| Amortiguador      | 10X                      | 1X                | 2.5                |
| MgCl <sub>2</sub> | 50 mM                    | 3.0 mM            | 1.5                |
| ADN molde         | 10 ng $\mu\text{L}^{-1}$ | 25 ng             | 2.5                |
| Taq Pol           | 5 U $\mu\text{L}^{-1}$   | 1.5 U             | 0.3                |
| Iniciador         | 10 ng $\mu\text{L}^{-1}$ | 30 ng             | 3                  |

**Cuadro 6.** Condiciones de temperatura, duración y número de ciclos de amplificación de la PCR para la obtención de patrones de tipo ISSR.

| Etapas                | Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>(segundos) | Número de<br>ciclos |
|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Pre-desnaturalización | 93                  | 60                   | 1                   |
| Desnaturalización     | 93                  | 20                   |                     |
| Alineamiento          | *                   | 60                   | 40                  |
| Extensión             | 72                  | 20                   |                     |
| Extensión final       | 72                  | 360                  | 1                   |

\* La temperatura de alineamiento dependió de la  $^{\circ}\text{T}_m$  recomendada para cada iniciador; ésta se indica en el Cuadro 4.

Los productos obtenidos al término de la reacción fueron separados por electroforesis durante una hora (150 V) en un gel de agarosa al 2 %, colocando un marcador de peso molecular y utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 0.25 X. La tinción del gel para la visualización de los fragmentos se llevó a cabo empleando bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y posteriormente se capturó una imagen utilizando un transiluminador de luz UV.

#### 4. Recopilación de información etnobotánica

Se realizaron un total de 75 encuestas en las localidades de origen de las UBC's analizadas. Éstas fueron dirigidas principalmente a predios particulares, recolectores y vendedores, así como a comercios locales formales e informales. Para ello se seleccionaron un total de 31 variables relacionadas con el conocimiento etnobotánico, usos y prácticas agronómicas.

#### 5. Análisis estadístico

**Caracterización molecular.** Con la información obtenida en los geles de agarosa se construyó una matriz binaria de ausencia / presencia de productos amplificados, utilizando como base el código estándar para datos doble estado (0 para ausencia, 1 para presencia).

**5.1 Descriptiva de marcadores.** A partir de esta matriz básica de datos se realizó el análisis descriptivo para marcadores utilizando el programa InfoGen® (Universidad de Córdoba, Argentina), el cual mide las siguientes variables: número de bandas polimórficas (BP), monomórficas (BM) y totales (BT), proporción de loci polimórficos (PMF), contenido de información polimórfica (PIC), error estándar del PIC (EE), porcentaje de amplificación (AMP), y la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) por medio de la siguiente fórmula:

$$PDICMA = P_i (X_D)^n$$

Donde:  $X_D$  representa el índice de similitud promedio para los pares de comparaciones calculado como:

$$X_D = \frac{2 N_{AB}}{N_A + N_B}$$

En este caso  $N_{AB}$  indica el número de bandas presentes en las dos muestras comparadas,  $N_A$  y  $N_B$  representan el número total de bandas en las muestras A y B respectivamente y el superíndice  $n$  es el número promedio de productos de amplificación por muestra (Wetton *et al.*, 1987).

**5.2 Matriz de similitud.** Adicionalmente se construyó una matriz de similitud fenética entre pares de UBCs con el programa NTSYSpc Ver. 2.21q utilizando el coeficiente de asociación de Dice, el cual se calcula como:

$$S_D = \frac{a}{\frac{(a+b) + (a+c)}{2}} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

Donde:  $a$  indica el número de bandas presentes en ambos individuos;  $b$  el número de bandas presentes en el primer individuo, pero no en el segundo; y  $c$  el número de bandas presentes en el segundo individuo, pero no en el primero.

**5.3 Análisis de agrupamiento.** A partir de dicha matriz de similitud se llevó a cabo el análisis de agrupamiento o cluster empleando el método jerárquico, secuencial, aglomerativo y anidado SAHN (*Sequential, Agglomerative, Hierarchical and Nested*) y el algoritmo de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

Para validar el agrupamiento obtenido se calculó el coeficiente de correlación cofenética como medida de distorsión, además se realizó un remuestreo (bootstrapping 1,000 muestras) y el dendograma final se construyó considerando la matriz de similitud promedio.

**5.4 Índice de diversidad genética de Shannon-Weaver y análisis de varianza molecular (AMOVA).** Por otro lado, se calculó el índice de diversidad genética de Shannon-Weaver de acuerdo a tres poblaciones establecidas *a-priori* empleando criterios geográficos, mediante la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum_i^s P_{ij} \times \ln P_{ij}$$

Donde:  $s$  denota el número de caracteres (bandas) consideradas;  $P_{ij}$  es la frecuencia del carácter  $i$  (banda  $i$ ) en la población  $j$ . Este análisis se realizó con el programa POPGENE (Population Genetic Analysis) Ver. 1.32.

Para definir la partición de la variación genética total en sus componentes, dentro y entre poblaciones, se llevó a cabo un análisis jerárquico de variación molecular, por medio de las distancias genéticas al cuadrado entre pares de UBCs.

Tanto la significancia de los componentes de varianza como los estadísticos derivados, se obtuvieron mediante métodos de permutación, evitando así los usuales supuestos de normalidad. Este análisis se llevó a cabo con el paquete InfoGen® (Universidad de Córdoba, Argentina).

**5.5 Análisis de coordenadas principales (ACOORP).** Con objeto de corroborar los agrupamientos obtenidos se procedió a realizar un análisis de coordenadas principales, considerando las bandas generadas por los iniciadores como loci individuales. Se obtuvieron los valores propios para cada coordenada, así como el porcentaje de variación acumulada.

Se realizó el gráfico de sedimentación y la visualización de las distancias en un sólo plano empleando las dos primeras coordenadas. Estos planos vectoriales se obtuvieron a partir de la descomposición espectral de la matriz de similitud promedio generando un conjunto de autovalores y autovectores. Cada uno de los nuevos ejes fueron ordenados en forma decreciente respecto a su autovalor asociado, el cuál proporcionó una medida de la variación explicada sobre cada eje, expresada porcentualmente respecto a la variación total del modelo.

**5.6 Análisis espacial de la variabilidad genética.** Se evaluó la correlación lineal entre la distancia geográfica y la disimilitud genética por medio de la Prueba de Mantel, en donde el estadístico Z se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$r_{XY} = \frac{SP(X,Y)}{\sqrt{SS(X) \cdot SS(Y)}}$$

Donde: el numerador representa la covarianza entre matrices comparadas, y el denominador la raíz cuadrada del producto de las varianzas de cada matriz.

Para llevar a cabo dicho análisis se construyó una matriz de distancias geográficas esferoidales en kilómetros (km), a partir de la información de latitud y longitud de las

localidades de procedencia de cada una de las UBCs (Anexo 1), utilizando el método del gran círculo:

$$\text{CosD} = (\text{Sen}(\text{Lat}_1) \times \text{Sen}(\text{Lat}_2)) + (\text{Cos}(\text{Lat}_1) \times \text{Cos}(\text{Lat}_2) \times \text{Cos D Long})$$

Al comparar las matrices se obtuvo el coeficiente de correlación lineal ( $r$ ) y el  $p$ -valor como medida de significancia.

**Aspectos etnobotánicos.** La información obtenida mediante las encuestas fue transformada a variables categóricas asignando un valor numérico a cada respuesta (Cuadro 7). Posteriormente se realizó un análisis de correspondencia múltiple y se calcularon las medidas de discriminación. Estas pruebas estadísticas se llevaron a cabo usando el programa IBM SPSS Statistics Ver. 25.

**Cuadro 7.** Categorización de las variables sociales de conocimiento local, usos y manejo del chile Chiltepín obtenidas a partir de 75 encuestas.

| Variable | Descripción                         | Estados de la variable |                         |
|----------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1        | Sitio de entrevista                 | Predio particular      | Comercio local formal   |
|          |                                     | Lugar de recolección   | Comercio local informal |
| 2        | Sexo                                | Masculino              | Femenino                |
|          |                                     | Hasta 30               | 51 a 60                 |
| 3        | Edad                                | 31 a 40                | 61 o más                |
|          |                                     | 41 a 50                |                         |
| 4        | Escolaridad                         | Primaria               | Preparatoria            |
|          |                                     | Secundaria             | Licenciatura            |
| 5        | Número de integrantes de la familia | 1 a 4                  | 8 a 10                  |
|          |                                     | 5 a 7                  | 11 o más                |
| 6        | Actividad económica principal       | Agricultura            | Oficios                 |
|          |                                     | Comercio               | Otros                   |
|          |                                     | Ganadería              |                         |

**Cuadro 7...** Continuación

| <b>Variable</b> | <b>Descripción</b>                        | <b>Estados de la variable</b> |                           |
|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 7               | <b>Pertenencia a grupo indígena</b>       | Sí                            | No                        |
| 8               | <b>Método de obtención del fruto</b>      | Cultivo                       | Recolección               |
| 9               | <b>Nombres comunes</b>                    | Chiltepín                     | Timpinchile               |
|                 |                                           | Chile de monte                | Amashito                  |
|                 |                                           | Piquín                        | Pajarito                  |
| 10              | <b>Uso principal</b>                      | Alimenticio                   | Medicinal                 |
| 11              | <b>Reconocimiento de diferentes tipos</b> | Sí                            | No                        |
| 12              | <b>Tipos que son reconocidos</b>          | Un solo tipo                  | Redondo y alargado        |
|                 |                                           | Rojo y amarillo               | Alargado grande y pequeño |
|                 |                                           | Indistinto                    | Rojo alargado             |
| 13              | <b>Preferencia del producto</b>           | Rojo                          | Alargado grande           |
|                 |                                           | Rojo redondo                  |                           |
|                 |                                           | Todo el año                   | Marzo a Octubre           |
| 14              | <b>Época de recolección</b>               | Enero a Octubre               | Septiembre a Diciembre    |
|                 |                                           | Febrero a Octubre             | Octubre a Diciembre       |
| 15              | <b>Destino del producto</b>               | Autoconsumo                   | Ambos                     |
|                 |                                           | Venta                         |                           |
|                 |                                           | No lo consume                 | Cocteles                  |
| 16              | <b>Platillos que se preparan</b>          | Salsas                        | Conservas                 |
|                 |                                           | Enchiladas y salsas           |                           |
| 17              | <b>Sitios de venta</b>                    | No lo vende                   | Local comercial           |
|                 |                                           | Mercados locales              |                           |
| 18              | <b>Estado del producto en venta</b>       | En fresco                     | Ambos                     |
|                 |                                           | En seco                       |                           |

**Cuadro 7...** Continuación

| <b>Variable</b> | <b>Descripción</b>                                                               | <b>Estados de la variable</b> |                        |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| 19              | <b>Precio por Kilogramo (\$)</b>                                                 | 100 a 150                     | 350 a 500              |
|                 |                                                                                  | 200 a 300                     |                        |
| 20              | <b>Cantidad que se recolecta para autoconsumo (g)</b>                            | 150 a 250                     | 450 o más              |
|                 |                                                                                  | 300 a 400                     |                        |
| 21              | <b>Cantidad que se recolecta para venta (Kg)</b>                                 | 2 a 4                         | 10 a 15                |
|                 |                                                                                  | 5 a 8                         | 20 o más               |
|                 |                                                                                  | 1 a 10                        | 31 a 50                |
| 22              | <b>Años de recolección</b>                                                       | 11 a 20                       | 50 o más               |
|                 |                                                                                  | 21 a 30                       |                        |
| 23              | <b>Sitio de recolección</b>                                                      | Traspatio                     | Parcelas               |
| 24              | <b>Intercambio de planta y/o semilla</b>                                         | Sí                            | No                     |
| 25              | <b>Tipo de manejo</b>                                                            | Ninguno                       | Riego                  |
| 26              | <b>Integrantes que se encargan de la recolección</b>                             | Toda la familia               | Mujeres y niños        |
|                 |                                                                                  | Ambos padres                  | Padre                  |
| 27              | <b>Integrantes que se encargan de la venta</b>                                   | Ambos padres                  | Mujeres y niñas        |
|                 |                                                                                  | Padre                         |                        |
| 28              | <b>Intentos de cultivo</b>                                                       | Sí                            | No                     |
|                 |                                                                                  | Germinación                   | Bajo rendimiento       |
| 29              | <b>Motivos de éxito o fracaso</b>                                                | Establecimiento de plántula   | Condiciones climáticas |
|                 |                                                                                  | Lento crecimiento             |                        |
| 30              | <b>Conocimiento de marcas nacionales o internacionales de venta del producto</b> | Sí                            | No                     |
| 31              | <b>Consumo de productos procesados</b>                                           | No                            | Chile en polvo         |
|                 |                                                                                  | Salsas envasadas              |                        |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Caracterización molecular

La cantidad de ADN obtenida a partir de los dos tipos de tejidos utilizados fue diferente (Apéndice 2). En el caso de la extracción a partir de semilla se obtuvieron cantidades de material genético que oscilaron de 34 hasta 373 ng/μL (145.1 en promedio). De acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 el 58.8 % de las muestras procesadas presentaron una calidad aceptable, mientras que el 21.6 % presentó contaminación con compuestos aromáticos y el 19.6 % restante mostró contaminación con sales, carbohidratos y/o fenoles. En el gel de calidad de agarosa se observaron bandas claras de alto peso molecular, acompañadas de barridos ligeros que indican la fragmentación parcial del material durante su tratamiento. Del total de las muestras analizadas, el 96.22 % presentó amplificación durante las diferentes reacciones de PCR.

La extracción de ADN a partir de hojas jóvenes produjo concentraciones que variaron entre 2.7 y 99.2 ng/μL (47.13 en promedio), por lo que los rendimientos fueron menores a los obtenidos a partir de semilla. De acuerdo a la relación de absorbancia 260/280 el 57.9 % de las muestras presentaron pureza óptima, mientras que 5.2 % de ellas sólo mostraron un rango aceptable. En el 36.9 % restante se determinó contaminación por ARN. El gel de calidad permitió la visualización de una única banda nítida de alto peso molecular en todos los casos. Además, se observó un 93.75 % de amplificación en el total de las reacciones.

Los resultados del método de extracción y purificación de ADN a partir de diferentes muestras de tipo biológico tienen una repercusión significativa en la sensibilidad y reproducibilidad de los análisis moleculares. La elección y aplicación de las diferentes técnicas depende del organismo en estudio, los propósitos de la investigación, el tipo de tejido disponible, así como su estado de conservación, la infraestructura y recursos con que se cuenta y en gran medida de la habilidad de extracción (Alejos *et al.*, 2014). Cada sistema particular de marcadores presenta requerimientos específicos. Por ejemplo, los marcadores basados en hibridación y secuenciación, requieren que el material genético purificado sea abundante, de alto peso molecular y libre de contaminación, mientras que los marcadores basados en PCR presentan exigencias menores (Singh y Singh, 2015).

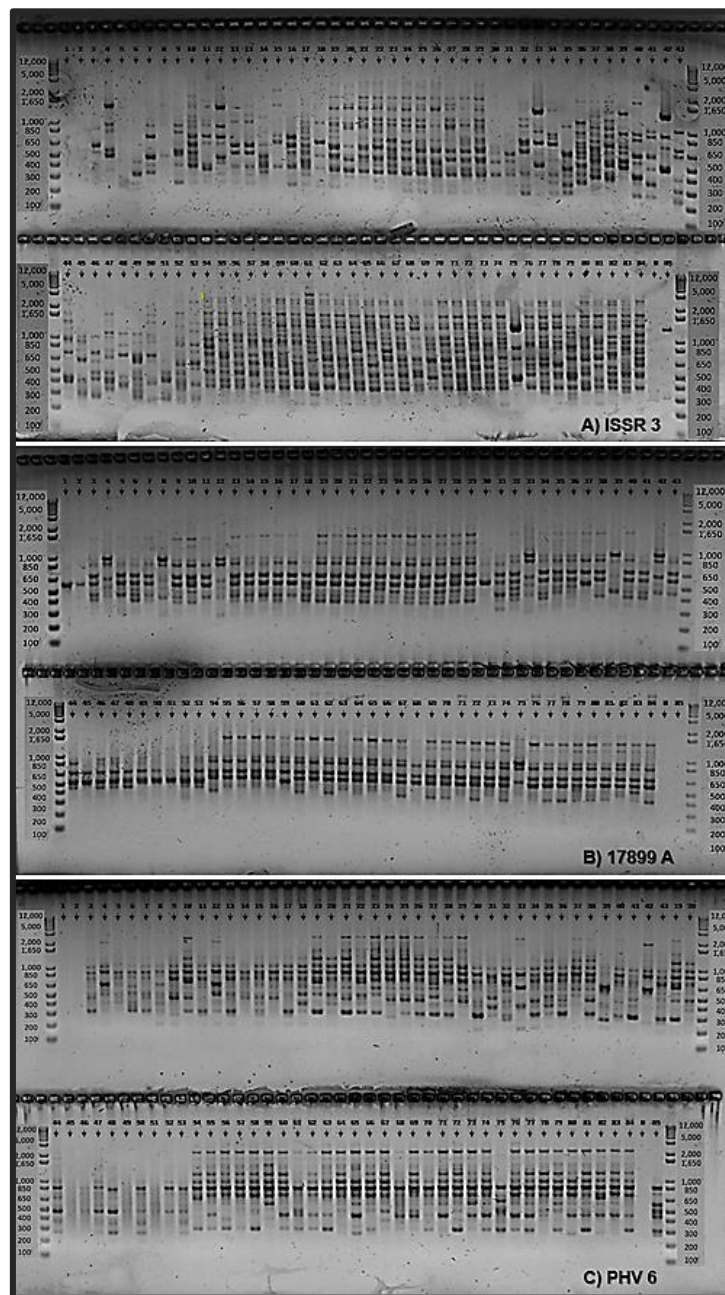
En el caso del chile Chiltepín, la extracción de ADN a partir de semilla, representa una alternativa viable, considerando la dificultad en la germinación y por lo tanto en la obtención de tejido joven. El protocolo usado en el presente estudio permitió la purificación de material genético con buen rendimiento y calidad aceptable, lo cual permite la ejecución de diferentes técnicas.

En relación a los perfiles moleculares de tipo ISSR se obtuvo un total de 136 bandas amplificadas, de las cuales únicamente dos fueron monomórficas, por lo que el porcentaje de polimorfismo fue de 98.5 %. El número de bandas obtenidas por cada iniciador varió de 9 a 23, con un promedio de 13.6; mientras que la frecuencia de las bandas generadas osciló entre 0.10 hasta 0.78.

Los resultados obtenidos muestran que los ISSR son marcadores moleculares que proporcionan mayor cantidad de información que otros marcadores también dominantes. Así el uso de RAPDs con 11 iniciadores aleatorios para evaluar la variabilidad genética de 43 poblaciones procedentes de Sonora, Chihuahua, Arizona y Guatemala generó 96 bandas totales (en promedio 8.7 bandas por iniciador), de las cuales sólo 36 fueron polimórficas (37.5 % de polimorfismo) (Votava *et al.*, 2002). De manera similar cuando se usaron marcadores AFLP (tres combinaciones enzimáticas) para el análisis de la diversidad genética de 74 accesiones, del total de bandas obtenidas, únicamente 68 de ellas fueron polimórficas (Guzmán *et al.*, 2005).

Los marcadores ISSR son un tipo de marcador dominante altamente polimórfico y pueden considerarse como una herramienta útil en estudios de diversidad genética ya que permiten la diferenciación de individuos y poblaciones (Culley y Wolfe, 2001). Así en un estudio realizado en cuatro poblaciones de *Capsicum annuum* de la India en el cual se usaron iniciadores ISSRs de di y trinucleótidos, así como distintos métodos de tinción (bromuro de etidio o fluorescencia), se obtuvieron 212 bandas (30 en promedio por iniciador) y 288 bandas (36 por iniciador), respectivamente. Mientras que mediante el uso de fluorescencia y un secuenciador automático fue posible contabilizar 556 bandas (141 en promedio por iniciador) (Kumar *et al.*, 2001). Por lo que los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la utilidad de los marcadores ISSR para el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones de chile Chiltepín.

En la Figura 7 se pueden apreciar los patrones de bandeo obtenidos con 3 de los 10 iniciadores ISSR evaluados en el presente estudio. Éstos fueron nítidos y las bandas generadas estuvieron bien definidas, lo cual facilitó su clara codificación en la Matriz Básica de Datos como 0 (ausencia) ó 1 (presencia). Estos perfiles moleculares muestran claras diferencias entre las UBCs de Chile Chiltepín evaluadas.



**Figura 7.** Perfiles moleculares de ISSR obtenidos con los iniciadores: A) ISSR-03, B) 17899 A y C) PHV-06 en 70 colectas de Chile Chiltepín. Marcador de peso molecular (1 Kb) en ambos extremos.

**1.1 Descriptiva de marcadores.** El análisis de los perfiles moleculares de las 70 UBCs demostró que no hubo muestras duplicadas. El porcentaje de polimorfismo total obtenido mediante el uso de los 10 iniciadores seleccionados fue de 98.53%. El iniciador que más amplicones produjo fue el ISSR 3 (23 bandas) con un 41.74% de amplificación a través de todas las UBCs (Cuadro 8).

Los valores más altos de contenido de información polimórfica (PIC) fueron registrados para los iniciadores: ISSR 3, MESL 2, PHV 6, 17898 B y PI 04. Éstos superan la mitad del rango esperado para el PIC (0.01 a 0.50), es decir, fueron los más informativos y, por tanto, se consideran de gran utilidad para subsecuentes estudios de caracterización en esta especie.

La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) también correspondió al iniciador ISSR 3 (Cuadro 8). Esto indica que dicho iniciador presentó un gran poder discriminante para la separación de las UBCs consideradas.

**Cuadro 8.** Descriptiva de 10 marcadores ISSR usados para la obtención de perfiles moleculares de 70 UBCs de Chile Chiltepín.

|           | <b>Iniciador</b> | <b>BP</b> | <b>BM</b> | <b>BT</b> | <b>PMF</b> | <b>PIC</b> | <b>E.E.</b> | <b>AMP</b> | <b>PDICMA</b> |
|-----------|------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|------------|---------------|
| <b>1</b>  | ISSR 9           | 14        | 0         | 14        | 1.00       | 0.30       | 0.02        | 52.65      | 1.6 E-11      |
| <b>2</b>  | ISSR 3           | 23        | 0         | 23        | 1.00       | 0.34       | 0.01        | 41.74      | 1.9 E-16      |
| <b>3</b>  | MESL 2           | 12        | 0         | 12        | 1.00       | 0.33       | 0.01        | 52.38      | 1.7 E-14      |
| <b>4</b>  | 17898 B          | 12        | 0         | 12        | 1.00       | 0.32       | 0.01        | 50.48      | 6.9 E-13      |
| <b>5</b>  | PI 02            | 12        | 0         | 12        | 0.92       | 0.30       | 0.01        | 56.90      | 5.7 E-12      |
| <b>6</b>  | LOL 8            | 13        | 0         | 13        | 0.92       | 0.29       | 0.02        | 56.70      | 7.6 E-11      |
| <b>7</b>  | 17899 A          | 11        | 0         | 11        | 1.00       | 0.30       | 0.01        | 64.68      | 5.4 E-12      |
| <b>8</b>  | PHV 6            | 18        | 0         | 18        | 1.00       | 0.32       | 0.01        | 54.60      | 1.3 E-12      |
| <b>9</b>  | LOL 12           | 7         | 2         | 9         | 0.78       | 0.22       | 0.02        | 68.73      | 7.0 E-09      |
| <b>10</b> | PI 04            | 12        | 0         | 12        | 1.00       | 0.32       | 0.01        | 42.50      | 1.9 E-13      |
|           | <b>Total</b>     | 134       | 2         | 136       |            |            |             | 52.75      | 1.5 E-118     |

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.

Se ha propuesto que la especificidad de locus y la reproducibilidad de los ensayos ISSR pueden aumentarse mediante el incremento de la temperatura de alineamiento y de la longitud de los iniciadores. De este modo se reduce la probabilidad de que ocurran apareamientos no específicos de los iniciadores con el ADN blanco y, que después de la amplificación resulten en variaciones en los patrones de bandeo debidas a las condiciones del procedimiento y no a cambios genéticos (Godwin *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2001).

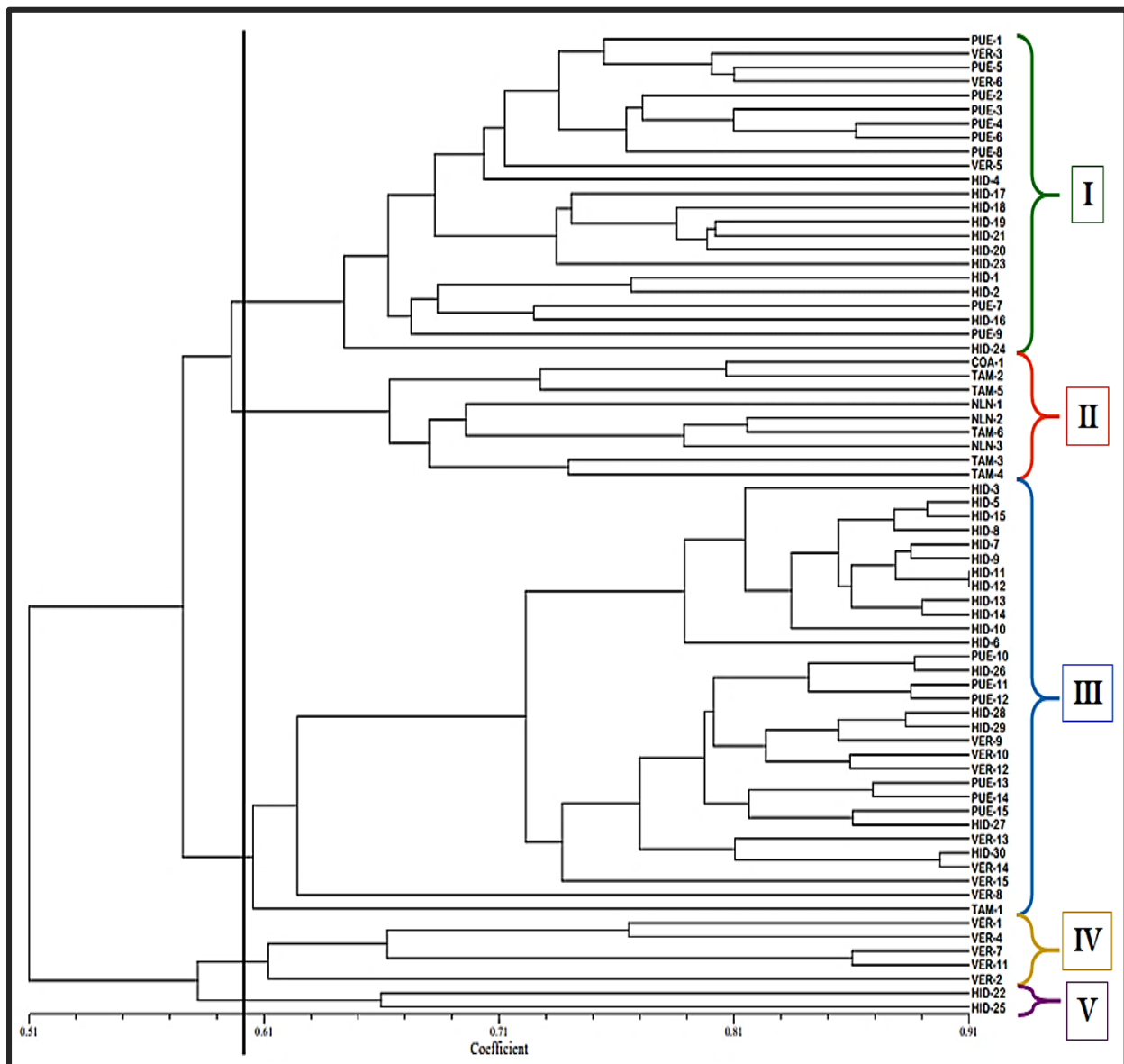
**1.2 Análisis de agrupamiento.** A partir de las distancias genéticas de Dice entre pares de UBCs se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA. El dendograma obtenido a partir de 1,000 remuestreos se presenta en la Figura 8. En ella se puede apreciar la formación de cinco grupos.

En el grupo I y el III se ubicaron las UBCs provenientes de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz. A pesar de que inicialmente se consideró que las UBCs provenientes de la zona geográfica de las huastecas deberían tener un alto grado de similitud genética entre ellas, este resultado demuestra que este no es el caso. De manera que más que la zona geográfica de procedencia, al parecer el factor altitud fue clave para la diferenciación de las UBCs. Así, la mayor parte de las muestras aglomeradas dentro del grupo I fueron obtenidas de localidades ubicadas a bajas altitudes (de 115 a 450 msnm), mientras que las UBCs que conformaron el grupo III se desarrollan a mayor altitud (de 500 a 970 msnm). Por lo que el agrupamiento obtenido indica que las colectas de dicha zona a pesar de constituirse como poblaciones simpátricas presentan diferenciación genética entre ellas, motivo por el cual se separan en dos grupos. Por tanto, esta región puede considerarse como un sitio de alta diversidad.

El grupo II se formó por nueve de las diez UBCs provenientes de la región Noreste de México, particularmente de los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. A pesar de que el dendrograma muestra una cierta relación genética entre estos materiales y los del grupo I, conformaron un conjunto bien diferenciado. Esta separación era esperada debido a que las condiciones ecológicas que prevalecen en dicha zona geográfica son de clima mucho más seco que el que se presenta en la región Huasteca; adicionalmente, existen claras diferencias morfológicas en los frutos de ambas procedencias, mientras

que los del noreste tienden a ser redondos, los del centro son en su mayoría alargados (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004).

Sólo una de las UBCs provenientes del estado de Tamaulipas no se agrupó junto con el resto de las colectas de la misma zona geográfica. Esta discrepancia podría deberse al movimiento de recursos genéticos de esta especie llevado a cabo por los productores, por lo que pudo haber provenido inicialmente de algún lugar de la Huasteca o zonas aledañas.



**Figura 8.** Dendrograma de 70 UBCs de Chile Chiltepín construido utilizando el coeficiente de asociación de Dice y el método de ligamiento promedio UPGMA, a partir de la amplificación por PCR de 10 iniciadores de tipo ISSR.

El grupo IV estuvo conformado por todas las UBCs provenientes del sur del estado de Veracruz, región cercana a la zona costera, con clima cálido húmedo. Desde el punto de vista morfológico, mostraron frutos alargados, pero de mayor tamaño respecto al resto de las colectas evaluadas en este trabajo.

El grupo V estuvo constituido únicamente por dos UBCs procedentes del estado de Hidalgo pero que se diferenciaron claramente del resto por presentar frutos redondos que pueden ser de color amarillo y/o rojo a la madurez, morfológicamente muy similares a la variante de chile Chiltepín considerada como representativa del estado de Yucatán (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004).

Como método de validación interna se construyó una matriz cofenética y el coeficiente de correlación obtenido fue  $r = 0.84355$ .

**1.3 Índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) y análisis de varianza molecular (AMOVA).** En el planteamiento original del presente estudio se definieron *a priori* tres zonas geográficas de colecta: Región Noreste, Región Huasteca y Región Costera. El índice de diversidad biológica de Shannon-Weaver estimado para las UBCs por procedencia geográfica se muestra en el Cuadro 9.

**Cuadro 9.** Índice de Shannon-Weaver, número y porcentaje de loci polimórficos para tres poblaciones determinadas *a priori* de acuerdo a su localización geográfica.

|          | <b>Población</b> | <b><math>H'</math></b> | <b>Lp</b> | <b>% Lp</b> |
|----------|------------------|------------------------|-----------|-------------|
| <b>1</b> | Región Noreste   | 0.3162                 | 91        | 66.91       |
| <b>2</b> | Región Huasteca  | 0.5484                 | 132       | 97.06       |
| <b>3</b> | Región Costera   | 0.2657                 | 67        | 49.26       |

$H'$ : Índice de Shannon-Weaver; Lp: Numero de loci polimórficos; % Lp: Porcentaje de loci polimórficos dentro de cada población.

Adicionalmente se calculó la diversidad genética multipoblacional la cual fue de  $H_t = 0.5486$ . A partir de estos valores se obtuvo la proporción de la variación genética que se encuentra dentro de las poblaciones como se indica a continuación:

$$\frac{\text{Promedio de la diversidad intrapoblacional } (H_s)}{\text{Diversidad multipoblacional } (H_t)} \times 100$$

$$= \frac{\left( \frac{0.3162 + 0.5484 + 0.2657}{3} \right)}{0.5486} \times 100 = \frac{0.3768}{0.5486} \times 100 = 68.68\%$$

Este valor muestra que el mayor porcentaje de la variabilidad molecular (68.68 %) se concentra al interior de las poblaciones, siendo la región Huasteca (que incluye los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz) la más diversa ( $H_s = 0.5484$ ). Este resultado coincide con Hernández-Verdugo *et al.* (2001) quienes reportaron un índice de diversidad de  $H' = 0.474$  para poblaciones de chiles silvestres del Noroeste de México.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) arrojó resultados similares (Cuadro 10). Este indica que el mayor porcentaje de diferenciación se encuentra dentro de las poblaciones (75.85 %) mientras que el 24.17 % de la variación se distribuye entre las mismas.

**Cuadro 10.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para las 70 UBCs de Chile Chiltepín

| FV               | gl | SC      | CM     | CV    | PV     | P-valor  |
|------------------|----|---------|--------|-------|--------|----------|
| Interpoblacional | 2  | 244.27  | 122.14 | 7.81  | 24.17  | < 0.0001 |
| Intrapoblacional | 67 | 1641.50 | 24.50  | 24.50 | 75.83  | < 0.0001 |
| Total            | 69 | 1885.77 | 27.33  | 32.31 | 100.00 |          |

FV: Fuente de variación; gl: grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; CM: Cuadrados medios; CV: Componente de varianza estimado; PV: Porcentaje de variación; P-valor: probabilidad de significancia.

La distribución no aleatoria de la variabilidad en poblaciones conespecíficas se conoce como estructura genética; ésta se define por diversos factores como tasa de mutación, deriva, selección, flujo génico, sistema reproductivo, distribución geográfica y mecanismos de dispersión (Rao y Hodgkin, 2002).

Durante el proceso de domesticación, las plantas cultivadas son expuestas a condiciones ecológicas distintas a las de sus centros de origen y se encuentran bajo fuertes presiones

de selección, lo cual resulta en cambios en su morfología y fisiología. Estos cambios provocan que las poblaciones cultivadas se diferencien respecto de sus progenitores silvestres y sus parientes cercanos (Gepts, 2004; Casas *et al.*, 2007).

De manera general, las especies silvestres, a diferencia de las plantas cultivadas, mantienen altos niveles de variación genética, por lo que no es sorprendente que en el caso del chile Chiltepín, dado su carácter silvestre, muestre alta variabilidad genética dentro de poblaciones, a diferencia de los chiles cultivados, los cuales generalmente presentan una mayor variación entre poblaciones (Doebley *et al.*, 2006).

No obstante, se ha reportado una disminución drástica, en más del 50 %, de la diversidad genética del chile Chiltepín, debido a factores como fragmentación del hábitat, fluctuaciones climáticas y el efecto de ciertas presiones antropogénicas como la sobreexplotación (González-Jara *et al.*, 2011).

**1.4 Análisis de coordenadas principales.** Un análisis de ordenación permite, a partir de la reducción de la dimensionalidad, explicar la mayor parte de la variabilidad existente en una muestra. El análisis de coordenadas principales es un método multivariado que permite el uso de variables cualitativas y ha sido una herramienta útil para explorar las relaciones entre UBCs a partir de marcadores dominantes como RAPDs, ISSRs y AFLPs.

La variación total acumulada para las primeras dos coordenadas fue de 76.82 %. La coordenada 1 representó el 46.25 %, mientras que a la 2 le correspondió el 30.57 % (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Análisis de coordenadas principales y partición de varianza molecular de 70 UBCs de chile Chiltepín.

| Coordenada   | Alfa de Cronbach | Total (autovalor) | % de Varianza |
|--------------|------------------|-------------------|---------------|
| 1            | 0.983            | 32.379            | 46.256        |
| 2            | 0.967            | 21.401            | 30.572        |
| <b>Total</b> | 0.996            | 53.780            | 76.829        |

En la representación gráfica de este análisis (Figura 9), de forma general se puede observar un grupo compacto en el cuadrante I constituido por UBCs de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz. Este cúmulo es consistente con el grupo I establecido en el análisis de agrupamiento, diferenciándose entre sí por la inclusión de la UBC HID-20.

Para el caso de las colectas de la región Noreste, éstas se localizaron junto con las de la Huasteca en el cuadrante I, a diferencia de lo obtenido en el dendrograma, dentro del cual este grupo de accesiones se diferenció claramente del anterior, aunque se pudo observar una relación cercana a las UBCs del grupo I.

El resto de las UBCs provenientes de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz se posicionaron dentro del segundo y tercer cuadrante. El eje de las ordenadas separó del resto del grupo a la colecta 1 proveniente del estado de Tamaulipas, situación que coincide con el análisis de agrupamiento, donde este material quedó fuera del grupo III. Estos resultados sugieren que dicha colecta debe tener una constitución genética muy particular, por lo que podría resultar de interés el estudiarla en mayor detalle para analizar su posible inclusión en un eventual programa de mejoramiento genético de esta especie.

Las colectas HID-22 e HID-25 se diferenciaron del resto de los materiales debido a la coloración amarilla y a la forma redonda de sus frutos.

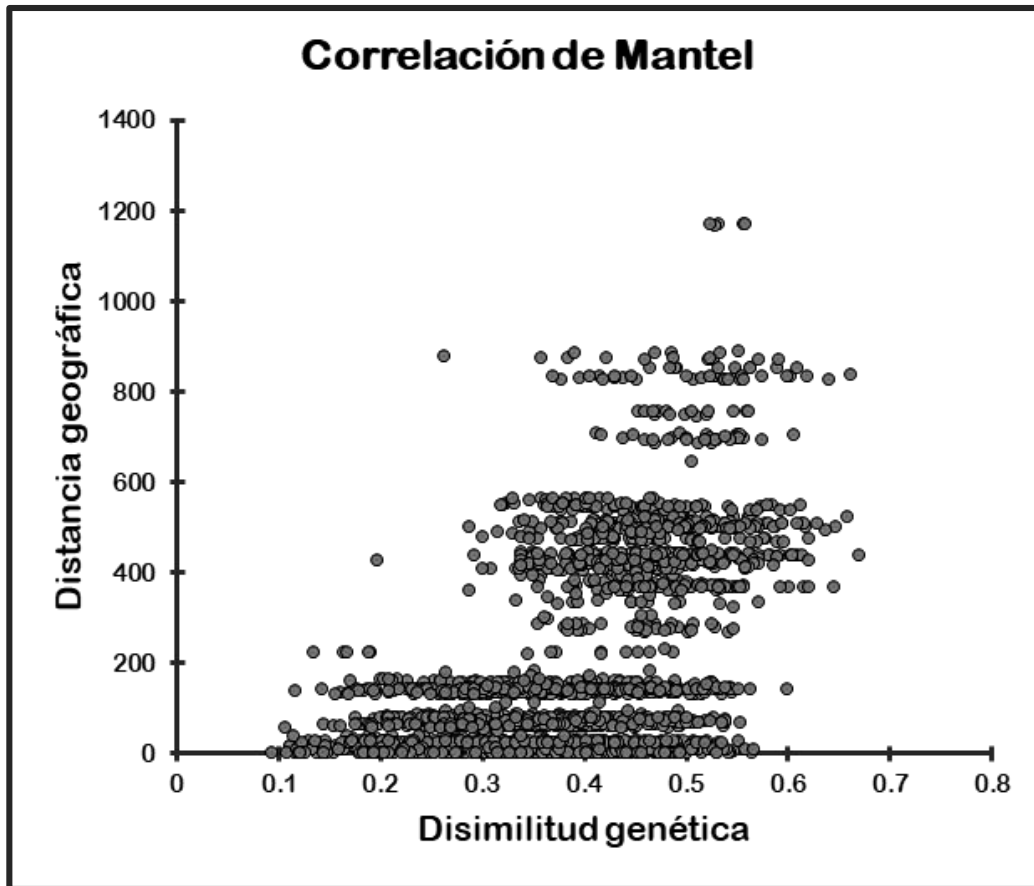
Las accesiones provenientes del sur de Veracruz se agruparon juntas y se localizaron en la parte inferior del gráfico.

La comparación de los resultados obtenidos del análisis de ordenación (ACoorP) con respecto a los producidos a partir del análisis de agrupamiento (dendrograma), mostraron una similitud del 97 %, ya que 68 de las 70 UBCs evaluadas fueron clasificadas u ordenadas de la misma forma.

Estos resultados corroboran la robustez del análisis de agrupamiento y sugieren que las relaciones encontradas entre las distintas colectas de chile Chiltepín se deben a su similitud genética y no a distorsiones ocasionadas por los supuestos matemáticos usados en la construcción de cada uno de los modelos.



en forma positiva, es decir, a mayor distancia geográfica hay mayor disimilitud genética. Sin embargo, el coeficiente de correlación entre matrices  $r = 0.535$  fue bajo, lo cual sugiere que a una misma distancia geográfica se podrían encontrar UBCs que difieran genéticamente (Figura 10).



**Figura 10.** Prueba de Mantel para las matrices de disimilitud genética y distancia geográfica ( $r=0.535$ ;  $P < 0.0001$ ).

Este resultado parece corroborar lo observado previamente, ya que si la mayor proporción de la diversidad del Chile Chiltepín se encuentra dentro de las poblaciones, el patrón geográfico esperado mostraría individuos genéticamente distintos que comparten un área común. Cuando la correlación es estadísticamente significativa, se dice que existe estructura espacial; sin embargo, ésta es de tipo lineal y los patrones espaciales subyacentes no son gráficamente reconocibles. En dicho caso los individuos son similares entre sí en regiones contiguas y se diferencian a largas distancias (Legendre y Fortin, 2010).

Los estudios de diversidad de las poblaciones se basan en el hecho de que la variabilidad de las especies tiene una distribución no aleatoria y que se pueden definir e identificar patrones de variación. El origen geográfico, ecológico o ambiental de los individuos, suele ser un buen indicador de la divergencia entre las poblaciones, además de señalar adaptaciones específicas. Es un criterio simple y efectivo para clasificar germoplasma (Abadie y Berretta, 2010).

La distribución espacial de especies cultivadas refleja la adaptación ecogeográfica y las preferencias de los agricultores, mientras que en los parientes silvestres estos patrones no suelen ser claros. Un estudio previo realizado en Chiltepín por Loaiza-Figueroa *et al.* (1989) a partir de nueve sistemas isoenzimáticos, concluyó que la diferenciación genética encontrada estuvo correlacionada con el aislamiento geográfico de las poblaciones. Este modelo se observó en poblaciones alopátricas del Noroeste y Noreste de México que se encontraban a 900 km de distancia, separadas por la región árida denominada Altiplano Central. Este aislamiento parece haber persistido por un largo tiempo, ya que hubo una migración baja o nula entre ellas, favoreciendo su divergencia (Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989).

Otro estudio sobre la diversidad genética y la distancia geográfica entre especies cultivadas y semicultivadas del género *Capsicum* fue llevado a cabo por Aguilar-Meléndez *et al.* (2009). En dicho estudio se estableció a la península de Yucatán como un posible centro de diversificación debido a la presencia un gran número de haplotipos entre accesiones silvestres, las cuales se diferencian entre sí y con respecto a las poblaciones del Este y Oeste de la República Mexicana.

## **2. Análisis etnobotánico**

El análisis de la información etnobotánica obtenida a través de las 75 encuestas realizadas (Cuadro 12) permite concluir que, de la población muestreada, el 30.7 % correspondió a predios particulares, 30.7 % a recolectores, 12.0 % a comercios formales y el 26.7 % a comercios informales. La mayor proporción de individuos encuestados (29.3 %) tenían entre 31 y 40 años de edad. El nivel de escolaridad predominante fue preparatoria (40.0 %) y un número muy reducido de los entrevistados concluyó los

estudios superiores (5.3 %). Las familias estuvieron constituidas en su mayoría por cinco a siete integrantes (46.7 %) y la principal actividad económica es el comercio minorista (57.3 %), seguida por la agricultura a pequeña escala (26.7 %). El 34.7 % de la población muestreada indicó pertenecer a un grupo indígena.

La denominación local de los chiles silvestres es muy variable y suele depender de las características y tipo de uso, así como del intercambio cultural entre regiones geográficas adyacentes (Guzmán *et al.*, 2005; Araiza *et al.*, 2011). Los nombres comunes con los que se conoce a la especie *C. annuum* var. *glabriusculum* son: Chiltepín (38.7 %), chile de monte (34.7 %), Piquín (10.7 %), Amashito (9.3 %), Timpimchile (5.3 %) y pajarito (1.3 %). Se ha referido que la palabra Chiltepín proviene del vocablo “*chilli*” que significa chile y “*tecpin*” pulga (Bañuelos *et al.*, 2008).

El color que adquiere el chile Chiltepín a la madurez permite clasificar a los diferentes tipos entre los que presentan un color rojo intenso y aquellos que son de color amarillo y un 32 % de los encuestados reconocen y diferencian estos tipos. Las principales formas del fruto se describen como alargados (los cuales pueden ser de distintos tamaños) y los redondos. La preferencia de autoconsumo y mercado de dicho fruto se concentra en los tipos alargados y de color rojo brillante de acuerdo con el 29.3 % de los encuestados; este tipo de fruto es sumamente apreciado y preferido en el mercado nacional e internacional aún sobre los tipos jalapeño y serrano, dado su sabor, grado de pungencia y baja irritabilidad del sistema digestivo (Laborde y Pozo, 1982; Rodríguez del Bosque *et al.*, 2004).

El principal uso del chile Chiltepín es el alimenticio (90.7 %). Se han realizado estudios bioquímicos que lo consideran como una fuente importante de compuestos antioxidantes y vitaminas C y E (Wahyuni *et al.*, 2013; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Otro uso de los frutos es el medicinal (9.3 %), donde se ha empleado para mitigar las molestias de trastornos gastrointestinales como gastritis y úlceras, para tratar dolores de garganta y oídos, resfriados y tos común (Nabhan *et al.*, 1990; Bañuelos *et al.*, 2008).

La época de recolección varía según la región, por ejemplo, en la zona del Noreste (Tamaulipas y Nuevo León) se efectúa durante los meses de septiembre a diciembre, mientras que en la Huasteca se pueden encontrar frutos casi todo el año. El 72 % de los

recolectores acude a pequeñas colinas, montes y/o a parcelas, que son sitios de cultivo aledaños a las comunidades, mientras que el 28 % aprovecha únicamente plantas de traspatio. Esta actividad es realizada mayormente por mujeres y niños (54.7 %) y representa una labor estacional de importancia económica de fuerte apego cultural para las comunidades rurales (Bañuelos *et al.*, 2008).

El destino de la producción se establece de forma muy específica: 30.7 % se destina al autoconsumo y 24 % a la venta, mientras que el 45.3 % restante se divide indistintamente para ambos fines. En relación al autoconsumo, el 49.1 % de los encuestados consumen entre 150 a 250 g al año, 43.9 % entre 300 a 400 g mientras que sólo el 7 % consume 450 g o más. El chile Chiltepín se emplea comúnmente en la preparación de enchiladas, salsas, cocteles y conservas, y se considera un elemento icónico de la cocina tradicional mexicana (Bañuelos *et al.*, 2008).

El chile Chiltepín se comercializa principalmente en los mercados informales locales (48.0 %) y sólo el 21.3 % de la producción se ofrece en locales comerciales establecidos formalmente. Estos frutos se comercializan principalmente en fresco (63.5 %, ya sea en verde o rojo), aunque en ciertas épocas del año se puede encontrar seco o en conserva (32.7 %). El precio por kilogramo varía de \$100 a \$500 pesos mexicanos, siendo más costoso en la región Noreste respecto a Hidalgo, Puebla y Veracruz. No obstante, el costo promedio reportado por los encuestados es considerablemente menor al registrado por ejemplo para el estado de Sonora (\$700 en promedio) ya que en dicha zona se realiza la exportación de hasta seis toneladas anuales de chile Chiltepín rojo en seco, principalmente hacia California y Arizona (Montes *et al.*, 2006).

Puesto que todos los frutos consumidos o comercializados provienen de recolección, el 90.7 % de los encuestados reportó no realizar alguna práctica de manejo y sólo el 9.3 % indica aplicar riegos esporádicos. Las poblaciones silvestres han experimentado un decremento significativo debido a la creciente demanda por el producto, a su consecuente extracción del medio natural y a la falta de estrategias de producción (González-Jara *et al.*, 2011; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

El 32 % de los encuestados ha realizado intentos de cultivo que no han prosperado por diferentes causas, tales como la escasa o nula germinación de la semilla (41.7 %) y la

subsecuente dificultad en el establecimiento de plántulas (8.3 %), el lento crecimiento y desarrollo de los arbustos (16.7 %), así como el bajo rendimiento obtenido (25.0 %). Otro aspecto que limita el cultivo de esta especie son las condiciones climáticas adversas, fundamentalmente en la región Noreste (8.3 %). La nula o baja germinación de las semillas es una característica común en plantas silvestres y refleja una adaptación a las condiciones ecológicas persistentes. Esta característica representa la mayor limitante para la explotación comercial del chile Chiltepín; sin embargo, se han desarrollado mecanismos químicos, como el uso de ácido giberélico, y tratamientos de acondicionamiento metabólico que incrementan la germinación (Chen y Bradford, 2000; Araiza *et al.*, 2011).

Del total de los entrevistados, el 77.3 % afirma no conocer alguna marca nacional o internacional de distribución y venta de chile Chiltepín o sus derivados, y sólo el 22 % ha consumido algún producto procesado en forma de salsas envasadas (10.7 %) o chile en polvo (13.3 %).

**Cuadro 12.** Variables sociales y agronómicas de conocimiento, usos y manejo del chile Chiltepín en la vertiente oriental de México.

| Variable | Descripción                | Estados de la variable  | Porcentaje (%) |
|----------|----------------------------|-------------------------|----------------|
| 1        | <b>Sitio de entrevista</b> | Predio particular       | 30.7           |
|          |                            | Lugar de recolección    | 30.7           |
|          |                            | Comercio local formal   | 12.0           |
|          |                            | Comercio local informal | 26.7           |
| 2        | <b>Sexo</b>                | Masculino               | 72.0           |
|          |                            | Femenino                | 28.0           |
| 3        | <b>Edad</b>                | Hasta 30                | 8.0            |
|          |                            | 31 a 40                 | 29.3           |
|          |                            | 41 a 50                 | 20.0           |
|          |                            | 51 a 60                 | 18.7           |
|          |                            | 61 o más                | 24.0           |

**Cuadro 12...** Continuación

| Variable | Descripción                                | Estados de la variable | Porcentaje (%) |
|----------|--------------------------------------------|------------------------|----------------|
| 4        | <b>Escolaridad</b>                         | Primaria               | 26.7           |
|          |                                            | Secundaria             | 28.0           |
|          |                                            | Preparatoria           | 40.0           |
|          |                                            | Licenciatura           | 5.3            |
| 5        | <b>Número de integrantes de la familia</b> | 1 a 4                  | 21.3           |
|          |                                            | 5 a 7                  | 46.7           |
|          |                                            | 8 a 10                 | 25.3           |
|          |                                            | 11 o más               | 6.7            |
| 6        | <b>Actividad económica principal</b>       | Agricultura            | 26.7           |
|          |                                            | Comercio               | 57.3           |
|          |                                            | Ganadería              | 2.7            |
|          |                                            | Oficios                | 8.0            |
|          |                                            | Otros                  | 5.3            |
| 7        | <b>Pertenencia a grupo indígena</b>        | Sí                     | 34.7           |
|          |                                            | No                     | 65.3           |
| 8        | <b>Método de obtención del fruto</b>       | Cultivo                | 0              |
|          |                                            | Recolección            | 100            |
|          |                                            | Chiltepín              | 38.7           |
|          |                                            | Chile de monte         | 34.7           |
| 9        | <b>Nombres comunes</b>                     | Piquín                 | 10.7           |
|          |                                            | Timpinchile            | 5.3            |
|          |                                            | Amashito               | 9.3            |
|          |                                            | Pajarito               | 1.3            |
|          |                                            |                        |                |
| 10       | <b>Uso principal</b>                       | Alimenticio            | 90.7           |
|          |                                            | Medicinal              | 9.3            |

**Cuadro 12...** Continuación

| Variable | Descripción                               | Estados de la variable    | Porcentaje (%) |
|----------|-------------------------------------------|---------------------------|----------------|
| 11       | <b>Reconocimiento de diferentes tipos</b> | Sí                        | 42.7           |
|          |                                           | No                        | 57.3           |
| 12       | <b>Tipos que son reconocidos</b>          | Un solo tipo              | 57.3           |
|          |                                           | Rojo y amarillo           | 22.7           |
|          |                                           | Redondo y alargado        | 18.7           |
|          |                                           | Alargado grande y pequeño | 1.3            |
|          |                                           | Indistinto                | 57.3           |
| 13       | <b>Preferencia del producto</b>           | Rojo                      | 2.7            |
|          |                                           | Rojo redondo              | 9.3            |
|          |                                           | Rojo alargado             | 29.3           |
|          |                                           | Alargado grande           | 1.3            |
|          |                                           | Todo el año               | 6.7            |
| 14       | <b>Época de recolección</b>               | Enero a Octubre           | 6.7            |
|          |                                           | Febrero a Octubre         | 29.3           |
|          |                                           | Marzo a Octubre           | 44.0           |
|          |                                           | Septiembre a Diciembre    | 6.7            |
|          |                                           | Octubre a Diciembre       | 6.7            |
| 15       | <b>Destino del producto</b>               | Autoconsumo               | 30.7           |
|          |                                           | Venta                     | 24.0           |
|          |                                           | Ambos                     | 45.3           |
|          |                                           | No lo consume             | 24.0           |
| 16       | <b>Platillos que se preparan</b>          | Salsas                    | 28.0           |
|          |                                           | Enchiladas y salsas       | 42.7           |
|          |                                           | Cocteles                  | 2.7            |
|          |                                           | Conservas                 | 2.7            |

**Cuadro 12...** Continuación

| Variable | Descripción                                           | Estados de la variable | Porcentaje (%) |
|----------|-------------------------------------------------------|------------------------|----------------|
| 17       | <b>Sitios de venta</b>                                | No lo vende            | 30.7           |
|          |                                                       | Mercados locales       | 48.0           |
|          |                                                       | Local comercial        | 21.3           |
| 18       | <b>Estado del producto en venta</b>                   | En fresco              | 63.5           |
|          |                                                       | En seco                | 3.8            |
|          |                                                       | Ambos                  | 32.7           |
| 19       | <b>Precio por Kilogramo (\$)</b>                      | 100 a 150              | 73.6           |
|          |                                                       | 200 a 300              | 18.9           |
|          |                                                       | 350 a 500              | 7.5            |
| 20       | <b>Cantidad que se recolecta para autoconsumo (g)</b> | 150 a 250              | 49.1           |
|          |                                                       | 300 a 400              | 43.9           |
|          |                                                       | 450 o más              | 7.0            |
| 21       | <b>Cantidad que se recolecta para venta (Kg)</b>      | 2 a 4                  | 46.2           |
|          |                                                       | 5 a 8                  | 44.2           |
|          |                                                       | 10 a 15                | 3.8            |
|          |                                                       | 20 o más               | 5.8            |
| 22       | <b>Años de recolección</b>                            | 1 a 10                 | 20.0           |
|          |                                                       | 11 a 20                | 20.0           |
|          |                                                       | 21 a 30                | 26.7           |
|          |                                                       | 31 a 50                | 20.0           |
|          |                                                       | 50 o más               | 13.3           |
| 23       | <b>Sitio de recolección</b>                           | Traspatio              | 28.0           |
|          |                                                       | Parcelas               | 72.0           |
| 24       | <b>Intercambio de planta y/o semilla</b>              | Sí                     | 1.3            |
|          |                                                       | No                     | 98.7           |

**Cuadro 12...** Continuación

| Variable | Descripción                                                                      | Estados de la variable      | Porcentaje (%) |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| 25       | <b>Tipo de manejo</b>                                                            | Ninguno                     | 90.7           |
|          |                                                                                  | Riego                       | 9.3            |
|          |                                                                                  | Toda la familia             | 16.0           |
| 26       | <b>Integrantes que se encargan de la recolección</b>                             | Ambos padres                | 20.0           |
|          |                                                                                  | Mujeres y niños             | 54.7           |
|          |                                                                                  | Padre                       | 9.3            |
| 27       | <b>Integrantes que se encargan de la venta</b>                                   | Ambos padres                | 51.9           |
|          |                                                                                  | Padre                       | 5.8            |
|          |                                                                                  | Mujeres y niñas             | 42.3           |
| 28       | <b>Intentos de cultivo</b>                                                       | Sí                          | 32.0           |
|          |                                                                                  | No                          | 68.0           |
|          |                                                                                  | Germinación                 | 41.7           |
| 29       | <b>Motivos de éxito o fracaso</b>                                                | Establecimiento de plántula | 8.3            |
|          |                                                                                  | Lento crecimiento           | 16.7           |
|          |                                                                                  | Bajo rendimiento            | 25.0           |
|          |                                                                                  | Condiciones climáticas      | 8.3            |
| 30       | <b>Conocimiento de marcas nacionales o internacionales de venta del producto</b> | Sí                          | 22.7           |
|          |                                                                                  | No                          | 77.3           |
|          |                                                                                  | No                          | 76.0           |
| 31       | <b>Consumo de productos procesados</b>                                           | Salsas envasadas            | 10.7           |
|          |                                                                                  | Chile en polvo              | 13.3           |

Con el objetivo de buscar una correspondencia entre las variables etnobotánicas cuantificadas y los grupos geográficos establecidos *a priori* se realizó un agrupamiento mediante un análisis de correspondencia múltiple.

La varianza acumulada en las primeras dos dimensiones fue de 60.31 %, (32.6 en la primera y 27.7 en la segunda). Adicionalmente se calcularon las medidas de discriminación para cada variable, las cuales se presentan en el Cuadro 13.

Las variables etnobotánicas con mayor influencia en la primera dimensión fueron el destino (0.749) y estado (0.664) del producto, la cantidad que se recolecta para venta (0.661), el sitio de entrevista (0.659) y el precio por kilogramo (0.646).

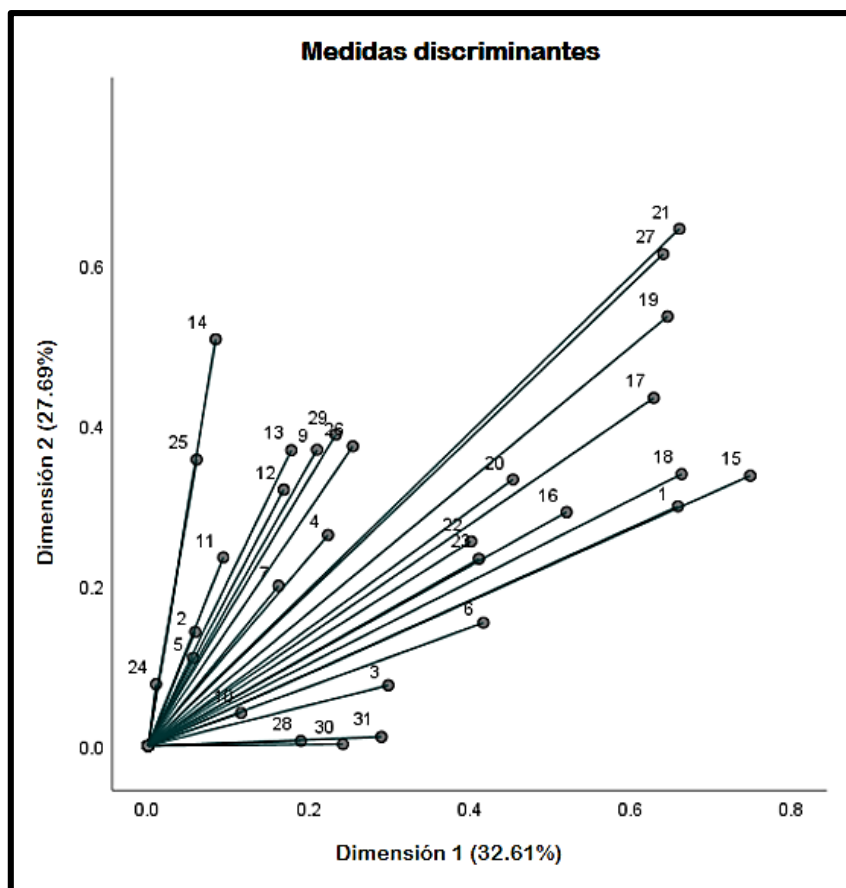
En la segunda dimensión las características que presentaron mayor influencia fueron nuevamente la cantidad que se recolecta para vender (0.645), los integrantes que se encargan de la venta (0.613), el precio por kilogramo (0.535), la época de recolección (0.507) y los sitios de venta (0.434) (Figura 11).

**Cuadro 13.** Medidas de discriminación de las variables etnobotánicas para las primeras dos dimensiones empleadas en la aplicación de 75 encuestas de conocimiento, manejo y usos del chile Chiltepín.

| Variable | Descripción                         | Dimensión 1 | Dimensión 2 |
|----------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| 1        | Sitio de entrevista                 | 0.659       | 0.298       |
| 2        | Sexo                                | 0.059       | 0.142       |
| 3        | Edad                                | 0.299       | 0.075       |
| 4        | Escolaridad                         | 0.224       | 0.263       |
| 5        | Número de integrantes de la familia | 0.056       | 0.11        |
| 6        | Actividad económica principal       | 0.417       | 0.153       |
| 7        | Pertenencia a grupo indígena        | 0.162       | 0.199       |
| 9        | Nombres comunes                     | 0.210       | 0.369       |
| 10       | Uso principal                       | 0.116       | 0.041       |
| 11       | Reconocimiento de diferentes tipos  | 0.094       | 0.235       |
| 12       | Tipos que son reconocidos           | 0.169       | 0.319       |

**Cuadro 13...** Continuación

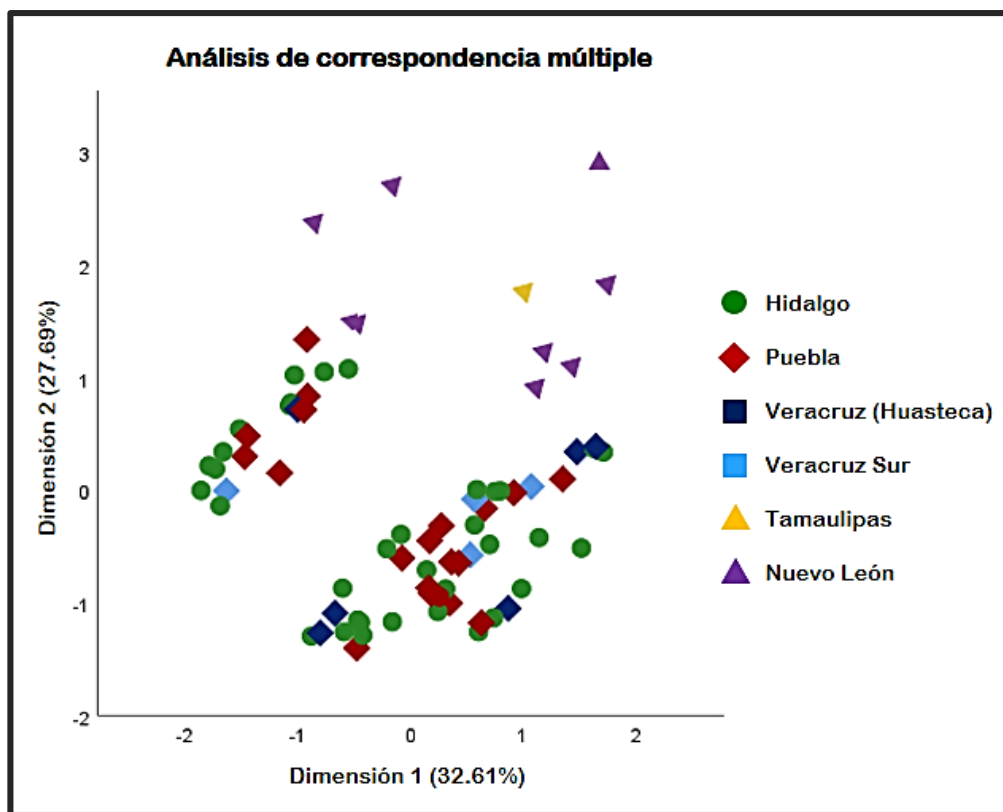
| <b>Variable</b> | <b>Descripción</b>                                                        | <b>Dimensión 1</b> | <b>Dimensión 2</b> |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 13              | Preferencia del producto                                                  | 0.178              | 0.368              |
| 14              | Época de recolección                                                      | 0.084              | 0.507              |
| 15              | Destino del producto                                                      | 0.749              | 0.337              |
| 16              | Platillos que se preparan                                                 | 0.521              | 0.291              |
| 17              | Sitios de venta                                                           | 0.629              | 0.434              |
| 18              | Estado del producto en venta                                              | 0.664              | 0.339              |
| 19              | Precio por Kilogramo (\$)                                                 | 0.646              | 0.535              |
| 20              | Cantidad que se recolecta para autoconsumo (g)                            | 0.454              | 0.332              |
| 21              | Cantidad que se recolecta para venta (Kg)                                 | 0.661              | 0.645              |
| 22              | Años de recolección                                                       | 0.402              | 0.255              |
| 23              | Sitio de recolección                                                      | 0.412              | 0.233              |
| 24              | Intercambio de planta y/o semilla                                         | 0.010              | 0.077              |
| 25              | Tipo de manejo                                                            | 0.060              | 0.357              |
| 26              | Integrantes que se encargan de la recolección                             | 0.255              | 0.373              |
| 27              | Integrantes que se encargan de la venta                                   | 0.641              | 0.613              |
| 28              | Intentos de cultivo                                                       | 0.190              | 0.006              |
| 29              | Motivos de éxito o fracaso                                                | 0.233              | 0.388              |
| 30              | Conocimiento de marcas nacionales o internacionales de venta del producto | 0.242              | 0.002              |
| 31              | Consumo de productos procesados                                           | 0.290              | 0.011              |



**Figura 11.** Proyección bidimensional de las medidas de discriminación de las variables etnobotánicas para las primeras dos dimensiones.

Con objeto de facilitar la visualización del grado de correspondencia entre las variables etnobotánicas cuantificadas y las poblaciones geográficas establecidas *a priori* se graficaron los casos en un espacio bidimensional (Figura 12); donde se observa que la región Noreste se separa claramente del resto, debido a que ciertas variables consideradas en el análisis difieren notoriamente, por ejemplo, los nombres comunes utilizados, la época de recolección de los frutos y el precio final por kilogramo.

El resto de los casos se ordenaron en sólo dos cúmulos en lugar de los tres esperados, lo cual refleja que no existe congruencia geográfica en el comportamiento de las variables etnobotánicas. Esto puede deberse a que los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz pertenecen a una misma zona de influencia cultural dada su cercanía espacial y convergencia de usos y costumbres en donde la demarcación política no resulta de relevancia.



**Figura 12.** Proyección bidimensional de las variables etnobotánicas y su relación con criterios geográficos.

Un estudio etnobotánico del chile Chiltepín realizado en el estado de Sonora establece que este producto tiene un vínculo cultural muy importante con sus consumidores, ya que se emplea en la preparación de platillos típicos de la región (como pozole, albóndigas, carne seca, panes, quesos y mermeladas) ya sea en verde, en rojo, en salmuera o vinagre, o bien en seco. Adicionalmente, debido a sus principios activos, el chile Chiltepín se ha incorporado a la medicina tradicional como antiparasitario, analgésico, antiácido y en la terapia tópica; también se reportó su uso en ritos ceremoniales y fiestas típicas. En esta zona la temporada de recolección se extiende de septiembre a diciembre y el mayor precio (\$600 a \$700 por Kg) lo alcanzan los frutos color rojo brillante (Bañuelos *et al.*, 2008).

En el estado de Sonora este chile silvestre se ha incorporado en el sector turístico mediante la implementación de la “Ruta del Chiltepín” en la cual se realizan recorridos por las áreas donde se distribuye, enfatizando la importancia de los recursos vegetales y de las asociaciones que presenta con plantas nodrizas bajo las cuales se desarrolla.

Complementariamente se realizan demostraciones de elaboración de salsas, degustaciones y venta de productos derivados que son procesados por marcas locales (Salido *et al.*, 2007; Bañuelos *et al.*, 2008).

La riqueza cultural mexicana está frecuentemente relacionada con el uso y aprovechamiento de los recursos naturales propios de cada región. El vínculo humano con los recursos fitogenéticos de importancia explica, en gran medida, las fluctuaciones poblacionales, así como la pérdida o conservación de la diversidad genética que contienen. El acervo de genes de los parientes silvestres de las plantas cultivadas constituye una herramienta esencial para el fitomejoramiento por lo que el estudio y comprensión de los patrones ecogeográficos de variación, permitirá establecer estrategias de conservación, uso y manejo de estos recursos genéticos (Charafi, 2008).

La importancia del Chiltepín no sólo radica en el mejoramiento de los chiles cultivados mediante la incorporación de genes, (por ejemplo, de resistencia al virus de la vena amarilla), sino que también es una fuente de compuestos fitoquímicos como antioxidantes, carotenoides, tocoferoles y vitaminas. Por otro lado, es un elemento icónico de trascendencia en la vida cotidiana, está presente en la gastronomía, la medicina, la identidad cultural y además representa una actividad económica generadora de recursos para las comunidades rurales.

## CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares de tipo ISSR son una herramienta útil para el estudio de la variabilidad genética existente en el chile silvestre *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*, ya que revelaron un alto nivel de polimorfismo.

Las relaciones genéticas establecidas por los análisis de agrupamiento y ordenación corresponden con criterios geográficos de proximidad, rango altitudinal y apariencia de los frutos.

La mayor parte de la variabilidad genética en esta especie se concentra al interior de las poblaciones, siendo la región Huasteca la más diversa.

No hubo una correspondencia clara entre disimilitud genética y distancia geográfica de los sitios de colecta.

La confluencia de usos y costumbres no permitió detectar una clara correspondencia entre las variables etnobotánicas estudiadas y los grupos geográficos preestablecidos.

Existe un vínculo cultural importante entre las comunidades rurales y los chiles silvestres ya que se constituyen como un recurso vegetal presente en la gastronomía, la medicina y como símbolo de identidad. Su recolección representa una actividad estacional económica relevante.

## LITERATURA CITADA

- Abadie, T., y Berretta, A. (2010). Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. En: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (Ed.), *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del cono sur*. San José (pp. 91-100) Montevideo, Uruguay: Procisur.
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P.L., Roose, M.L., and Kim, S.C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190–1202. doi: 10.3732/ajb.0800155
- Alejos, L., Aragón, M., y Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En: R. A. Cornejo, D. A. Serrato, B. R. Aguilar, y M. R. Munive. (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-25). Ciudad de México, México: SEMARNAT, INECC, UAM-I.
- Araiza L. N., Araiza L. E., y Martínez M. J. G. (2011). Evaluación de la germinación y crecimiento de plántula de chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) en invernadero. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13, 170-175. doi: 10.15446/rev.colomb.biote
- Bañuelos, N., Salido, P. L., y Gardea, A. (2008). Etnobotánica del Chiltepín. Pequeño gran señor de la cultura de los sonorenses. *Estudios sociales*, 16(32), 177-205. ISSN: 0188-4557 <http://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v16n32/v16n32a6.pdf>
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Pérez-Negrón, E., and Valiente-Banuet, A. (2007). *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Annals of Botany*, 100, 1101-1115. doi: 10.1093/aob/mcm126
- Charafi, J., Meziane, A., Moukhli, A., Boulouha, B., Modafar, C. and Khadari, B. (2008). Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 893–900. doi: 10.1007/s10722-007-9294-6
- Chen, F., and Bradford, K. J. (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology*, 124, 1265-1274. doi: 10.1104/pp.124.3.1265
- Culley, T., and Wolfe, A. (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86, 545-556. doi: 10.1086/50266
- Doebley, J. F., Gaut, B. S., and Smith, B. D. (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127, 1309–1321. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.006
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews*, 24, 1-44. doi: 10.1002/9780470650288.ch1

- Godwin, I. D., Aitken, E. A. B. and Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524-1528. doi: 10.1002/elps.1150180906
- González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., and García-Arenal, F. (2011). Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. *PLoS ONE*, 6(12), e28715. doi: 10.1371/journal.pone.0028715
- Guzmán, F. A., Ayala, H., Azurdia, C., Duque, M. C., and de Vicente, M. C. (2005). AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala. *Crop Science*, 45, 363–370. doi: 10.2135/cropsci2005.0363
- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., and Medina-Juárez, L. A. (2016). Wild Pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, Plant Morphology, Distribution, Genetic Diversity, Genome Sequencing, and Phytochemical Compounds. *Crop Science*, 56(1), 1-11. doi:10.2135/cropsci2014.11.0789
- Hernández-Verdugo, S., Dávila, A. P., y Oyama, K. (1999). Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 64, 65-84. doi: 10.17129/botsci.1583
- Hernández-Verdugo, S., Luna-Reyes, R., and Oyama, K. (2001). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Systematics and evolution*, 226(3-4), 129-142. doi: 10.1007/s006060170061
- Kumar, L. D., Kathirvel, M., Rao, G. V., and Nagaraju, J. (2001). DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Science International*, 116(1), 63-68. doi: 10.1016/S0379-0738(00)00350-9
- Laborde, J. A. y Pozo, C. O. (1982). *Presente y pasado del chile en México*. Ciudad de México, México: Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México 80 p.
- Legendre, P., Fortin, M. J. (2010). Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular ecology resources*, 10(5), 831-844. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02866.x
- Loaiza-Figueroa, F., Ritland, K., Cancino, J. A. L., and Tanksley, S. D. (1989). Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 165(3-4), 159-188. doi: 10.1007/BF00936000
- Medina, T., Rodríguez Del Bosque, L. A., Villalón, H., Pozo, O., Ramírez, M., López, R., Lara, M., Gaona, G., Cardona, A., y Mora, A. (2002). El chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) en el Noreste de México. Aspectos ecológicos y socioeconómicos. *Biotam nueva serie*, 13, 1-14.

- Montes, H. S., Ramírez, M. M., Villalón, M. H., Medina, M. T., Morales, C. A., Heredia, G. E., Soto, R. J. M., López, L. R., Cardona, E. A., y Martínez, T. H. L. (2006). Conservación y aprovechamiento sostenible de chile silvestre (*Capsicum* spp. Solanaceae) en México. En: L. P. López y H. S. Montes. (Eds.), *Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. INIFAP-CIR-CENTRO* (pp. 71-134). Libro científico. Núm. 1. Celaya, Guanajuato, México.
- Nabhan, G. P., Slater, M., and Yarger, L. (1990). New crops small farmers in marginal lands? Wild chiles as a case study. In: M.A. Altieri and S.B. Hecht. (Eds.), *Agroecology and small farm development* (pp. 19-34). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96, 129-133. doi: 10.1023/A:1002913228101
- Rao, R. V., and Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68, 1-19. doi: 10.1023/A:1013359015812
- Rodríguez del Bosque, L. A., Ramírez-Meraz, M., y Pozo-Campodonico, O. (2004). *Tecnología de producción de chile piquín en el noreste de México. Folleto técnico Núm. 29*. Río Bravo, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) 33 p.
- Salido, P., Bañuelos, N., Romero, D., Romo, E., Ochoa, A., López, M., y Wong, P. (2007) *Plan Rector para el Desarrollo Turístico Sustentable de la Ruta del Río Sonora*. Hermosillo, México: Comisión de Fomento al Turismo de Sonora. Coordinación de Desarrollo Regional del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 24 p.
- SIAP. (2010). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Información Agroalimentaria y Pesquera: Un panorama del cultivo del chile. <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
- Singh, B. D., and Singh, A. K. (2015). *Marker-assisted plant breeding: principles and practices*. New Delhi, India: Springer 514 pp.
- Votava, E. J., Nabhan, G.P., and Bosland, P. W. (2002). Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an *in situ* population and *ex situ* accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics*, 3(2), 123–129. doi: 10.1023/A:1015216504565
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., and Bovy, A. G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of Natural Products*, 76(4), 783–793. doi: 10.1021/np300898z
- Wetton, J. H., Carter, R. E., Parkin, D. T., and Walters, D. (1987). Demographic study of a wild House Sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327, 147-149. doi: doi.org/10.1038/327147a0

## APÉNDICES

**Apéndice 1.** Estado de procedencia, coordenadas geográficas, y altitud (msnm) de las 70 colectas de chile Chiltepín.

| Número de<br>colecta | Estado   | Coordenadas |    |    |        |    |    | MSNM |
|----------------------|----------|-------------|----|----|--------|----|----|------|
|                      |          | Lat N       |    |    | Long O |    |    |      |
|                      |          | °           | '  | "  | °      | '  | "  |      |
| 3                    | Puebla   | 20          | 06 | 03 | 97     | 37 | 35 | 523  |
| 4                    | Veracruz | 18          | 15 | 38 | 94     | 41 | 53 | 176  |
| 5                    | Hidalgo  | 20          | 57 | 31 | 98     | 29 | 29 | 360  |
| 6                    | Hidalgo  | 21          | 02 | 10 | 98     | 33 | 44 | 607  |
| 7                    | Puebla   | 20          | 06 | 09 | 97     | 37 | 15 | 522  |
| 8                    | Veracruz | 18          | 16 | 29 | 94     | 42 | 18 | 317  |
| 9                    | Veracruz | 20          | 41 | 20 | 98     | 00 | 38 | 290  |
| 10                   | Hidalgo  | 21          | 09 | 05 | 98     | 22 | 11 | 114  |
| 11                   | Puebla   | 20          | 06 | 38 | 97     | 37 | 26 | 575  |
| 12                   | Veracruz | 18          | 15 | 58 | 94     | 41 | 51 | 249  |
| 13                   | Puebla   | 20          | 06 | 42 | 97     | 37 | 30 | 578  |
| 14                   | Veracruz | 20          | 41 | 35 | 98     | 00 | 41 | 264  |
| 15                   | Puebla   | 20          | 06 | 47 | 97     | 37 | 39 | 581  |
| 16                   | Veracruz | 20          | 41 | 07 | 98     | 01 | 18 | 333  |
| 17                   | Puebla   | 20          | 06 | 26 | 97     | 37 | 15 | 603  |
| 18                   | Hidalgo  | 20          | 57 | 15 | 98     | 31 | 14 | 425  |
| 19                   | Hidalgo  | 21          | 04 | 45 | 98     | 42 | 05 | 820  |
| 20                   | Hidalgo  | 20          | 57 | 20 | 98     | 31 | 09 | 479  |
| 21                   | Hidalgo  | 21          | 02 | 07 | 98     | 33 | 46 | 628  |
| 22                   | Hidalgo  | 21          | 04 | 47 | 98     | 42 | 11 | 839  |
| 23                   | Hidalgo  | 21          | 02 | 58 | 98     | 33 | 55 | 729  |
| 24                   | Hidalgo  | 20          | 57 | 20 | 98     | 31 | 27 | 511  |
| 25                   | Hidalgo  | 20          | 57 | 27 | 98     | 31 | 27 | 581  |
| 26                   | Hidalgo  | 20          | 57 | 29 | 98     | 31 | 16 | 476  |

**Apéndice 1...** Continuación

| Número de<br>colecta | Estado     | Coordenadas |    |    |        |    |    | MSNM  |
|----------------------|------------|-------------|----|----|--------|----|----|-------|
|                      |            | Lat N       |    |    | Long O |    |    |       |
|                      |            | °           | '  | "  | °      | '  | "  |       |
| 27                   | Hidalgo    | 21          | 04 | 44 | 98     | 41 | 58 | 812   |
| 28                   | Hidalgo    | 21          | 09 | 08 | 98     | 21 | 27 | 116   |
| 29                   | Hidalgo    | 21          | 02 | 00 | 98     | 33 | 48 | 651   |
| 30                   | Puebla     | 20          | 06 | 01 | 97     | 37 | 42 | 560   |
| 31                   | Hidalgo    | 21          | 02 | 05 | 98     | 33 | 45 | 642   |
| 32                   | Hidalgo    | 21          | 08 | 53 | 98     | 22 | 03 | 140   |
| 33                   | Veracruz   | 18          | 15 | 20 | 94     | 41 | 57 | 151   |
| 34                   | Puebla     | 20          | 05 | 47 | 97     | 37 | 27 | 509   |
| 35                   | Hidalgo    | 20          | 57 | 32 | 98     | 29 | 39 | 390   |
| 36                   | Hidalgo    | 21          | 08 | 53 | 98     | 21 | 59 | 126   |
| 37                   | Hidalgo    | 21          | 03 | 09 | 98     | 33 | 50 | 778   |
| 38                   | Hidalgo    | 20          | 57 | 22 | 98     | 31 | 28 | 533   |
| 39                   | Hidalgo    | 21          | 01 | 54 | 98     | 33 | 44 | 672   |
| 40                   | Hidalgo    | 21          | 09 | 02 | 98     | 21 | 58 | 115   |
| 41                   | Hidalgo    | 21          | 01 | 53 | 98     | 33 | 49 | 681   |
| 42                   | Hidalgo    | 21          | 02 | 11 | 98     | 33 | 45 | 600   |
| 43                   | Puebla     | 20          | 05 | 38 | 97     | 37 | 33 | 517   |
| 44                   | Tamaulipas | 24          | 53 | 19 | 98     | 50 | 16 | 251   |
| 45                   | Coahuila   | 26          | 39 | 59 | 101    | 32 | 50 | 1,079 |
| 46                   | Tamaulipas | 23          | 25 | 24 | 99     | 18 | 39 | 607   |
| 47                   | Nuevo León | 24          | 45 | 49 | 99     | 27 | 00 | 337   |
| 48                   | Tamaulipas | 24          | 53 | 19 | 98     | 50 | 19 | 248   |
| 49                   | Tamaulipas | 24          | 14 | 10 | 99     | 26 | 15 | 324   |
| 50                   | Nuevo León | 24          | 40 | 20 | 99     | 32 | 10 | 366   |
| 51                   | Tamaulipas | 24          | 51 | 53 | 98     | 33 | 51 | 219   |
| 52                   | Tamaulipas | 24          | 33 | 25 | 98     | 56 | 15 | 494   |
| 53                   | Nuevo León | 24          | 50 | 10 | 99     | 33 | 18 | 383   |

**Apéndice 1...** Continuación

| Número de<br>colecta | Estado   | Coordenadas |    |    |        |    |    | MSNM |
|----------------------|----------|-------------|----|----|--------|----|----|------|
|                      |          | Lat N       |    |    | Long O |    |    |      |
|                      |          | °           | '  | "  | °      | '  | "  |      |
| 55                   | Puebla   | 20          | 05 | 49 | 97     | 37 | 34 | 503  |
| 56                   | Hidalgo  | 20          | 58 | 09 | 98     | 32 | 25 | 976  |
| 57                   | Puebla   | 20          | 06 | 25 | 97     | 37 | 42 | 593  |
| 58                   | Puebla   | 20          | 06 | 24 | 97     | 37 | 32 | 577  |
| 60                   | Puebla   | 22          | 05 | 52 | 97     | 36 | 41 | 621  |
| 62                   | Puebla   | 20          | 05 | 48 | 97     | 37 | 00 | 607  |
| 65                   | Puebla   | 20          | 05 | 50 | 97     | 37 | 46 | 512  |
| 67                   | Hidalgo  | 21          | 09 | 02 | 98     | 22 | 03 | 117  |
| 68                   | Veracruz | 20          | 41 | 28 | 98     | 00 | 29 | 283  |
| 70                   | Hidalgo  | 21          | 09 | 09 | 98     | 22 | 05 | 114  |
| 71                   | Veracruz | 20          | 41 | 38 | 98     | 00 | 24 | 335  |
| 72                   | Hidalgo  | 21          | 08 | 27 | 98     | 21 | 25 | 171  |
| 73                   | Veracruz | 20          | 40 | 59 | 98     | 00 | 42 | 286  |
| 75                   | Veracruz | 18          | 15 | 33 | 94     | 42 | 50 | 203  |
| 76                   | Veracruz | 20          | 41 | 24 | 98     | 00 | 54 | 317  |
| 80                   | Veracruz | 20          | 41 | 14 | 98     | 01 | 00 | 294  |
| 82                   | Hidalgo  | 21          | 04 | 05 | 98     | 21 | 36 | 288  |
| 83                   | Veracruz | 20          | 41 | 44 | 98     | 00 | 38 | 244  |
| 84                   | Veracruz | 20          | 41 | 00 | 98     | 00 | 06 | 397  |

**Apéndice 2.** Tejido de extracción de ADN, concentración en ng/μL y relación 260/280 de las 70 UBCs de chile Chiltepín.

| Número de colecta | Estado   | Tejido de extracción | [ng/μL] | Relación 260/280 |
|-------------------|----------|----------------------|---------|------------------|
| 3                 | Puebla   | Semillas             | 183.2   | 1.53             |
| 4                 | Veracruz | Semillas             | 188.1   | 1.47             |
| 5                 | Hidalgo  | Semillas             | 193.0   | 1.33             |
| 6                 | Hidalgo  | Semillas             | 354.0   | 1.33             |
| 7                 | Puebla   | Semillas             | 295.4   | 1.42             |
| 8                 | Veracruz | Semillas             | 51.2    | 1.22             |
| 9                 | Veracruz | Semillas             | 249.9   | 1.61             |
| 10                | Hidalgo  | Semillas             | 193.7   | 1.74             |
| 11                | Puebla   | Semillas             | 315.9   | 1.39             |
| 12                | Veracruz | Semillas             | 68.8    | 1.79             |
| 13                | Puebla   | Semillas             | 192.6   | 1.54             |
| 14                | Veracruz | Semillas             | 373.0   | 1.50             |
| 15                | Puebla   | Semillas             | 143.3   | 1.47             |
| 16                | Veracruz | Semillas             | 357.2   | 1.58             |
| 17                | Puebla   | Semillas             | 164.1   | 1.52             |
| 18                | Hidalgo  | Semillas             | 136.3   | 1.62             |
| 19                | Hidalgo  | Semillas             | 36.6    | 1.62             |
| 20                | Hidalgo  | Semillas             | 76.0    | 1.69             |
| 21                | Hidalgo  | Semillas             | 75.9    | 1.67             |
| 22                | Hidalgo  | Semillas             | 76.5    | 1.74             |
| 23                | Hidalgo  | Semillas             | 81.9    | 1.66             |
| 24                | Hidalgo  | Semillas             | 34.0    | 1.68             |
| 25                | Hidalgo  | Semillas             | 72.6    | 1.76             |
| 26                | Hidalgo  | Semillas             | 130.2   | 1.74             |
| 27                | Hidalgo  | Semillas             | 212.1   | 1.69             |
| 28                | Hidalgo  | Semillas             | 118.5   | 1.71             |
| 29                | Hidalgo  | Semillas             | 54.4    | 1.71             |

**Apéndice 2...** Continuación

| <b>Número de<br/>colecta</b> | <b>Estado</b> | <b>Tejido de<br/>extracción</b> | <b>[ng/μL]</b> | <b>Relación<br/>260/280</b> |
|------------------------------|---------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 30                           | Puebla        | Semillas                        | 46.5           | 1.39                        |
| 31                           | Hidalgo       | Semillas                        | 92.8           | 1.65                        |
| 32                           | Hidalgo       | Semillas                        | 154.5          | 1.70                        |
| 33                           | Veracruz      | Semillas                        | 51.3           | 1.72                        |
| 34                           | Puebla        | Semillas                        | 108.3          | 1.72                        |
| 35                           | Hidalgo       | Semillas                        | 180.5          | 1.71                        |
| 36                           | Hidalgo       | Semillas                        | 250.7          | 1.72                        |
| 37                           | Hidalgo       | Semillas                        | 258.4          | 1.67                        |
| 38                           | Hidalgo       | Semillas                        | 159.0          | 1.70                        |
| 39                           | Hidalgo       | Semillas                        | 62.8           | 1.57                        |
| 40                           | Hidalgo       | Semillas                        | 180.3          | 1.66                        |
| 41                           | Hidalgo       | Semillas                        | 106.6          | 1.58                        |
| 42                           | Hidalgo       | Semillas                        | 55.7           | 1.70                        |
| 43                           | Puebla        | Semillas                        | 130.4          | 1.54                        |
| 44                           | Tamaulipas    | Semillas                        | 77.2           | 1.69                        |
| 45                           | Coahuila      | Semillas                        | 89.4           | 1.47                        |
| 46                           | Tamaulipas    | Semillas                        | 134.3          | 1.62                        |
| 47                           | Nuevo León    | Semillas                        | 191.0          | 1.49                        |
| 48                           | Tamaulipas    | Semillas                        | 84.2           | 1.69                        |
| 49                           | Tamaulipas    | Semillas                        | 109.4          | 1.57                        |
| 50                           | Nuevo León    | Semillas                        | 103.9          | 1.65                        |
| 51                           | Tamaulipas    | Semillas                        | 113.8          | 1.56                        |
| 52                           | Tamaulipas    | Semillas                        | 118.1          | 1.53                        |
| 53                           | Nuevo León    | Semillas                        | 114.2          | 1.60                        |
| 55                           | Puebla        | Hojas                           | 52.9           | 1.92                        |
| 56                           | Hidalgo       | Hojas                           | 6.2            | 2.77                        |
| 57                           | Puebla        | Hojas                           | 93.8           | 1.65                        |
| 58                           | Puebla        | Hojas                           | 80.7           | 1.80                        |

**Apéndice 2...** Continuación

| <b>Número de<br/>colecta</b> | <b>Estado</b> | <b>Tejido de<br/>extracción</b> | <b>[ng/μL]</b> | <b>Relación<br/>260/280</b> |
|------------------------------|---------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 60                           | Puebla        | Hojas                           | 69.7           | 1.94                        |
| 62                           | Puebla        | Hojas                           | 37.3           | 1.94                        |
| 65                           | Puebla        | Hojas                           | 96.9           | 1.91                        |
| 67                           | Hidalgo       | Hojas                           | 58.9           | 1.92                        |
| 68                           | Veracruz      | Hojas                           | 3.8            | 1.92                        |
| 70                           | Hidalgo       | Hojas                           | 44.8           | 2.15                        |
| 71                           | Veracruz      | Hojas                           | 19.8           | 2.41                        |
| 72                           | Hidalgo       | Hojas                           | 60.7           | 2.05                        |
| 73                           | Veracruz      | Hojas                           | 15.9           | 2.27                        |
| 75                           | Veracruz      | Hojas                           | 16.8           | 2.48                        |
| 76                           | Veracruz      | Hojas                           | 13.8           | 2.61                        |
| 80                           | Veracruz      | Hojas                           | 36.0           | 2.21                        |
| 82                           | Hidalgo       | Hojas                           | 85.6           | 2.0                         |
| 83                           | Veracruz      | Hojas                           | 99.2           | 2.0                         |
| 84                           | Veracruz      | Hojas                           | 2.7            | 2.0                         |