EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

Caracterización agronómica y molecular de chile bobo: híbrido originado de la cruza de X´catik y Dulce (*Capsicum annuum* L.)

TESIS

Que presenta:

Manuel Joel Hernández Pinto

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:

Dr. René Garruña Hernández

Conkal, Yucatán, México

Enero, 2020

TecNM

EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México, a 28 de Enero del 2020

El comité de tesis del candidato a grado: Manuel Joel Hernández Pinto, constituido por los CC. René Garruña Hernández, Rubén Humberto Andueza Noh, Javier Orlando Mijangos Cortés y Luís Latournerie Moreno, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Caracterización agronómica y molecular de chile bobo: híbrido originado de la cruza de X´catik y Dulce (*Capsicum annuum* L.),** que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en ciencias en Horticultura Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. René Garruña Hernández
Director de Tesis

Dr. Rubén Humberto Andueza Noh
Co-director de Tesis

Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés
Asesor de Tesis

Dr. Luís Latournerie Moreno
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán, México, a 28 de Enero del 2020

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Manuel Joel Hernández Pinto

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría, No. de Registro: 850599.

A mi comité de tesis conformado por el Dr. René Garruña Hernández, Dr. Rubén Humberto Andueza Noh, Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés y Dr. Luís Latournerie Moreno, por la magnífica asesoría brindada a lo largo de lo que duró la maestría, por la increíble calidad humana que poseen, su paciencia y por haberme apoyado a concluir este documento.

Al Dr. René Garruña Hernández y al Dr. Rubén Humberto Andueza Noh por darme la oportunidad de trabajar bajo su cargo, por su paciencia, comprensión, ayuda, conocimiento y sabios consejos.

A mis compañeros de generación, por sus consejos, ayuda, convivencia, por los buenos y malos momentos, por sus aportaciones y aprendizaje obtenido de cada uno de ellos.

A mi familia: a mis padres Honorina Pinto Chale y Bernardino Hernández Balam, mis hermanos Rosalía, Tensi y Carlos, por su apoyo moral e incondicional, motivación y comprensión. A mi hija Melissa Hernández, por ser mi mayor motivación e inspiración para seguir superándome profesionalmente.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos ……..…….…..vi
Índice de cuadros vii
Indice de figuras viii
RESUMEN ix
I. CAPÍTULO 1 1
1.1 INTRODUCCIÓN 1
1.2 ANTECEDENTES.....2
1.2.1 El *genero capsicum* 2
1.2.2 Importanciade la especie……....2
1.2.3 Especies de *Capsicum* en Yucatán…….3
1.2.4 Caracteristicas morfologicas 3
1.2.4.1 Chile Dulce……...…3
1.2.4.2 Chile X´catik……...……...….4
1.2.4.3 Chile Bobo……..…….……4
1.2.5 Metodos de mejoramiento vegetal ..... …4
1.2.5.1 Hibridación 5
1.2.6 Marcadores morfologicos 5
1.2.7 Marcadores moleculares ..... ……..5
1.3 HIPOTESIS 7
1.4 OBJETIVOS 7
1.4.1 Objetivo general 7
1.4.2. Objetivos especificos 7
1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 8
1.6 LITERATURA CITADA 9

II CAPITULO 2 POTENCIAL AGRONÓMICO, PUREZA Y ESTRUCTURA GENÉTICA Y DE HÍBRIDOS F1 DE GENOTIPOS DE *CAPSICUM ANNUUM* L.

2.1 RESUMEN 12

2.2 INTRODUCCIÓN 13

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....14

2.3.1 material vegetal parental y cruzas para generar los híbridos……...….14

2.3.2 Siembra de parentales e híbridos……..15

2.3.3 Evaluación morfológica de híbridos y parentales……16

2.3.4 Diseño experimental y análisis estadístico 16

2.3.5 Evaluación molecular……17

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 19

2.4.1 caracteres morfológicos……19

2.4.2 Caracterización molecular…….…..28

2.5 CONCLUSIÓN..... 32

2.6 LITERATURA CITADA……..……...……..……...…33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) utilizados en los genotipos de *C. annuum.* 17

Cuadro 2. Prendimiento y aborto de flores fecundadas manualmente por cruzas Cruzas directas e indirectas entre dos genotipos progenitores de *C. annuum* 20

Cuadro 3. Caracteres cualitativos de flor de progenitores e híbridos F_1 de cruzas directas y recíprocas. 21

Cuadro 4. Caracteres cualitativos en planta de progenitores e híbridos F_1 de cruzas directas y recíprocas 23

Cuadro 5. Caracteres cualitativos en fruto de progenitores e híbridos F_1 de cruzas directas y recíprocas. 26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor abierta y madura de plantas de dos genotipos de *Capsicum annuum*, chile dulce (a) y chile x´catik (b). 15

Figura 2. Emergencia de las plántulas de genotipos de *C. annuum.* a) porcentaje de emergencia, b) peso de 100 semillas, c) tasa de emergencia y d) emergencia acumulada. 19

Figura 3. Caracteres agronómicos de planta en progenitores e híbridos F1 de Chile *C. annuum* cultivados en Yucatán, México. Los datos son medias, los valores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). 22

Figura 4. Caracteres agronómicos de hoja en progenitores e híbridos F1 de chile *C. annuum* sembrados en Yucatán, México. Los datos son medias, los valores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). 24

Figura 5. Caracteres agronómicos de fruto en progenitores e híbridos F1 de chile *C. annuum* sembrados en Yucatán, México 25

Figura 6. Perfil genético de 10 individuos del H1 con sus parentales a los lados M=marcador de peso molecular, pb= tamaño en pares de bases, Carriles 1,2,3 y 4 en color blanco perfil genético de los parentales. 28

Figura 7. Perfil genético de 10 individuos del H 2 con sus parentales a M= marcador de peso molecular, pb= tamaño en pares de bases, carriles 1,2,3 y 4 en color blanco perfil genético de los parentales. 28

Figura 8. Dendograma UPGMA mostrando las relacione genéticas de los genotipos parentales y híbridos evaluados. Obtenidos con diez iniciadores ISSR. 29

Figura 9. Análisis de coordenadas principales de 4 genotipos de *Capsicum annum.* se muestra un patrón de agrupamiento general basado principalmente en la constitución genética de la especie a la que pertenece cada genotipo. 31

Figura 10. Coeficiente de ancestría estimados por individuos de parentales e híbridos de *capsicum annum* evaluados. Cada individuo está representado por una línea vertical. Los colores representan el porcentaje de ancestría que aporta cada población para generar los híbridos de chile. 31

RESUMEN

La especie *Capsicum annum* es de gran importancia económica en México; en la península de Yucatán su importancia además de económica es botánica y gastronómica, pues se considera un centro de diversificación de cultivares de *C. annuum*, los cuales están poco caracterizados; no se cuenta con variedades mejoradas y la mayoría se produce únicamente en la península. Entre los genotipos que se siembran en Yucatán se incluyen los chiles: bobo, chawa ik, dulce, maax ik, yaax ik y x´catik. El chile bobo es una cruza espontanea entre los chiles dulce y x´catik, es poco conocido, no está caracterizado y no se sabe cuál es el receptor o cuál es el donante en los progenitores durante la cruza. Suele encontrarse en parcelas donde se cultivan el chile x´catik y el chile dulce. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue **caracterizar agronómica y molecularmente un híbrido de *C. annuum* originado de dos genotipos de interés comercial (chile X´catik x chile Dulce)**. Se evaluaron variables con base en los descriptores para la especie *c, annuum* del SNICS: Apl= altura de la planta; Lt= longitud tallo; Dt= diámetro tallo; Le= longitud del entrenudo; Lhj= longitud de hoja; Ahj= ancho de hoja; Lpd= longitud de pedúnculo; Lf= longitud del fruto; Af= ancho de fruto; Gpr= grosor del pericarpio; Lpc= largo del peciolo. De igual manera se evaluó el prendimiento del fruto y la emergencia de plántulas. En estas variables el porcentaje de prendimiento de frutos fue de 40 % y la emergencia de 95 %. En las variables longitud del fruto, grosor del pericarpio y longitud del pedúnculo el híbrido supero al chile Dulce en 67 (10.82 cm ± 0.28, 7.28 ± 0.20), 95 (2.60 mm ± 0.04, 2.49 ± 0.05) y 98 (2.60 cm ± 0.04, 2.57 mm ± 0.06)%, respectivamente; sin embargo, en esas mismas variables el chile X´catik superó al híbrido 71 (15.22 cm ± 0.54), 90 (2.87 mm ± 0.04) y 84% (3.06 cm ± 0.04), respectivamente. En las variables longitud de la hoja, diámetro de la hoja, longitud del peciolo y diámetro del fruto el hibrido supero al X´catik 90 (11.08cm ± 0.36, 10.06 ± 0.22), 90 (4.85 mm ± 0.10, 4.39 ± 0.12), 90 (3.74 cm ± 0.11, 3.39 ± 0.11) y 53% (43.3 mm ± 0.64, 23.28 ± 0.76) , respectivamente; sin embargo, .en esas mismas variables el dulce superó al hibrido 92 (12.04 cm ± 0.13), 98 (4.90 mm ± 0.16), 88 (4.25 cm ± 0.12) y 69% (62.66 mm ± 1.33). En la mayoría de las variables el híbrido presentó valores intermedios a sus progenitores. Sin embargo, en la altura el hibrido (46.70 cm ± 1.72) no hubo diferencias estadísticamente significativas con el dulce (57.80 ± 2.60) pero si con el parental X´catik (82.00 ± 4.21). En la longitud de tallo el hibrido (27.20 cm ± 0.43) fue estadísticamente diferente con los parentales: X´catik (16.90 cm ± 1.20) y Dulce (18.45 ± 0.77) pero entre los parentales no hubo diferencias estadísticas significativas. Para los resultados moleculares se realizaron nueve primers ISSR con buena respuesta para determinar el patrón de bandeo y el porcentaje de heredabilidad de los híbridos y la pureza, dichos marcadores darían la ventaja de reducir el tiempo de evaluación en diferentes cultivos. La disminución en el porte de la planta de los híbridos resultó favorable para aspectos de manejo de la planta; sin embargo, se requiere de estrategias de mejoramiento genético adicionales para mejorar el tamaño del fruto.

CAPITULO 1.

1.1 INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales centros de origen y domesticación del género *Capsicum* (Laborde y Pozo, 1984), así lo indican vestigios arqueológicos de semillas encontradas en el valle de Tehuacán, Puebla con una antigüedad de 8500 años (Evans, 1993). Actualmente se conocen cinco especies cultivadas y económicamente más importantes del género *Capsicum: C. annuum, C. chinense, C. frutescens, C. baccatum y C. pubescens* (Scaldaferro *et al*., 2018; Pickersgill B, 1997). La introducción de nuevas variedades desplaza a los cultivos criollos, poniendo en riesgo la diversidad genética (Trujillo-Aguirre *et al.,* 2005; Berretta *et al.,* 2010). En Yucatán hay una gran diversidad de fenotipos criollos de chile, los cuales se han conservado de generación en generación, con buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona, por lo que presentan atributos como rusticidad y tolerancia a plagas y enfermedades (Latournerie *et al*., 2001). Los chiles en Yucatán son utilizados como ingrediente en la gastronomía y como remedios en la medicina tradicional (Latournerie *et al.,* 2001). A diferencia de otras regiones del país, en la península de Yucatán aún se cultivan diferentes tipos de chiles criollos (e.g. dulce, x´ catik, maax, chawa' y ya´ax ik) (Terán *et al*., 1998; González *et al*., 2010), de los cuales el chile dulce y el chile x´catik son los más cultivados (Ix-Nahuat *et al*., 2013). Sin embargo, en ocasiones cuando los productores siembran estas poblaciones, algunas plantas tienen frutos con una forma diferente a la esperada (alargado con punta achatada), a este morfotipo comúnmente se le conoce como chile "bobo" y se ha determinado que proviene de una cruza azarosa no deseada al sembrar en la misma parcela plantas de chile Dulce y chile X´catik (Cázares *et al.,* 2005). Ante los precios elevados que alcanza el chile X´catik, el chile bobo se ha vuelto una alternativa para los consumidores, pues tiene un sabor similar y puede costar hasta cinco veces menos. El interés que ha despertado esta variante originada de la cruza de chile dulce y chile X´catik conlleva a generar información científica al respecto y aprovechar para desarrollar nuevas variedades adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de la región.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1 El género *Capsicum*

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae, que está dividida en dos subfamilias: Solanoideae y Cestroideae. Con características morfológicas, químicas y citogenéticas diferentes. Se cree que el complejo *"Capsicum annuum"* fue domesticado al menos dos veces, un tipo *C. annuum* en México y un tipo *C. chinense* en la Amazonía (Pickersgill, 1969).

En la Península de Yucatán se cuenta con una gran diversidad de fenotipos criollos de chile (Latournerie *et al.,* 2002), los cuales se identifican de acuerdo a los caracteres del fruto y se han conservado de generación en generación por su adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona y bajo un manejo de agricultura tradicional, por lo que presentan buenos atributos como son tolerancia a plagas y enfermedades, rusticidad, además del rol que juegan en platillos regionales o por sus usos medicinales (Latournerie *et al*., 2001).

Capsicum annuum es la especie más importante del género en México y en el mundo (González *et al*., 2010), con la cantidad de tipos de chiles que posee representa la mayor diversidad (González *et al.,* 2010). Por sus características edafoclimáticas y culturales, la Península de Yucatán constituye un centro de diversificación para cultivares de esta especie (González *et al.,* 2010).

1.2.2. Importancia de la especie

El valor comercial de este cultivo se ha incrementado debido a que se ha diversificado su uso. Además de alimento, condimento, medicina y la industria cosmética, los chiles se usan como plantas ornamentales en jardines (Bosland, 1994). Aunque los chiles no se consideran como uno de los cultivos de mayor importancia en el mundo, es una de las especies que más se cultiva y tiene importancia económica en algunos países (Mc Leod *et al.,* 1979). Es indispensable un conocimiento amplio de la variabilidad genética, tanto de las variedades silvestres como de las que se cultivan de manera tradicional y de las que se generan a partir del mejoramiento genético. Uno de los principales usos de la variabilidad genética de *C.*

annuum (González y Bosland, 1991) es como fuente de resistencia contra enfermedades. Una parte importante de la diversidad genética de chile en México se encuentra en la Península de Yucatán, donde se conserva como eje de subsistencia la agricultura tradicional (roza-tumba-quema). La carencia de información sistematizada sobre la variabilidad fenotípica y genética de la región Maya, hace necesario iniciar la documentación sobre los tipos de chiles cultivados y silvestres en Yucatán para su aprovechamiento y conservación dado su potencial genético.

1.2.3. Especies de *Capsicum* en Yucatán

Entre las especies de *C. annuum* que se siembran en Yucatán destacan los chiles: Dulce, X´catik, chawa', maax, sukurre y ya'ax ik (González *et al.*, 2010). En los chiles X´catik y Dulce son pocos los estudios realizados, enfocados a la caracterización fenotípica y agronómica, a pesar de ser junto con el chile habanero (*C. chinense*) los chiles con mayor importancia económica de la región (Ix-Nahuat *et al*., 2013).

1.2.4. Características morfológicas

1.2.4.1. Chile Dulce

Este chile es de ciclo anual, con hábito de crecimiento erecto, de tallo cilíndrico de color verde con escasa pubescencia y antocianinas en el nudo de color morado cuando la presenta (Aguilar *et al*., 2010). Existen diferentes variantes de este tipo de chile en donde el fruto puede ser de redondo a ligeramente alargado con los extremos achatados (frutos acampanulados y en forma de bloques) (Aguilar *et al.*, 2010).

1.2.4.2. Chile X´catik

El nombre X´catik proviene de la lengua maya y se traduce al español como rubio o güero, (Velasco-Morales, 2003). La planta de X´catik puede alcanzar una altura de 35 cm a 70 cm, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se siembre. El color de la hoja presenta diversas tonalidades en verde (de verde oscuro a verde claro).

El chile X´catik inmaduro es de color amarillo pálido, delgado, puntiagudo, de forma cónica alargada y algo ondulado; al madurar se torna de color naranja o rojo. Tiene una longitud que varía de 9.0 a 17.6 cm y un diámetro de 2.1 a 3.4 cm. Su peso fresco puede variar entre 23.2 y 55.8 g. En pungencia, puede ser moderadamente picoso o muy picoso (Pickersgill, 1971).

1.2.4.3. Chile Bobo

El chile bobo es una cruza espontánea entre los chiles Dulce y X´catik; es poco conocido y prácticamente no se consume. Suele encontrarse creciendo en parcelas comerciales donde se cultiva chile x´catik y chile dulce. El fruto es de forma oblonga alargada. Es de color verde en estado inmaduro y de color rojo ya maduro. Este chile no presenta capsaicinoides y por tanto no pica. El chile bobo presenta un gran potencial para la gastronomía por su gran tamaño y carencia de picor.

1.2.5. Métodos de mejoramiento vegetal

El mejoramiento en plantas es el arte y la ciencia de alterar o modificar la herencia de las plantas para obtener cultivares (variedades o híbridos) mejorados genéticamente, adaptados a condiciones específicas, de mayores rendimientos económicos y de mayor calidad que las variedades nativas o criollas (Estrada Salazar, 2002). Todos los métodos de mejoramiento tienen como objetivo seleccionar los mejores genotipos dentro de una población, o crear genotipos nuevos con características previamente definidas (Camarena *et al*., 2014).

El mejoramiento debe cubrir las necesidades de los agricultores, que exigen plantas altamente productivas, con resistencia o tolerancia a factores bióticos y/o abióticos, cambiar características de su fenotipo como tener hojas pequeñas o grandes, con entrenudos cortos o largos entre otras características morfológicas que facilitan el manejo agronómico y se reflejan en la disminución de los costos de producción, para determinadas especies (Ayala, *et al*., 2017).

1.2.5.1. Hibridación

La hibridación es una técnica para generar recombinaciones, para acelerar o mejorar los procesos naturales en el desarrollo de nuevas variedades para usos específicos, es la acción de fecundar dos individuos de distinta constitución genética, es decir, cruzar dos individuos diferentes para conseguir reproducir en la descendencia alguna de las características de los progenitores. Es posible también obtener caracteres no deseados durante el proceso de hibridación, es por ello por lo que tras la hibridación sea necesario un proceso de selección artificial durante varias generaciones, eliminando las plantas con rasgos no deseados (Ayala, *et al*., 2017). Teóricamente se predice que en promedio los híbridos tendrán menor adaptación que los padres, pero es posible que al menos algunos estén mejor adaptados que ambos padres al mismo ambiente (Bartón, 2001).

1.2.6. Marcadores morfológicos

Este tipo de marcadores son muy utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población y evaluar la respuesta de variaciones obtenidas mediante el mejoramiento genético (Cornell Universidad, 2003). Son consideradas características de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica como un objetivo determinado. Tienen ventaja de que son fácilmente realizables, no requieren de un equipo sofisticado y son la apreciación más directa de un fenotipo; por consiguiente, están al alcance para uso inmediato. Una limitante que presentan estos marcadores es que las especies siempre están sujetas a cambios debido a factores ambientales y a las diferentes etapas del desarrollo del cultivo (Nuez y carrillo, 2000).

1.2.7. Marcadores moleculares

Los marcadores son polimorfismos detectados en la secuencia del ADN. Estos polimorfismos pueden detectarse en el ADN nuclear y en el ADN de los organelos, mitocondrias y cloroplastos, y están basados en el análisis directo del genotipo de la planta, es decir afectan a la molécula de ADN y son considerados medidas objetivas de la variación. No están sujetas a las influencias ambientales, las pruebas pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo de las plantas y tienen el potencial de hallarse en número ilimitado por que abarcan

todo el genoma, lo que representa su mejor atributo (IPGRI, 2013; Karp y Edwards, 1997 y Picca *et al.*, 2004;). Los marcadores pueden ser utilizados para realizar estudios de: a) parentesco genético y pureza genética, b) diversidad genética, c) estudio del polimorfismo en razas locales y en cultivos, d) identificación de cultivares, variedades y taxonomía, e) estudios filogenéticos, f) estudios de domesticación y evolución, g) flujo de genes e introgresión y h) cartografía comparativa de genomas (Freeland, 2005; IPGRI,2003; Soltis y Soltis, 1998; Karp y Edwards, 1997). Una de las técnicas que ha tenido éxito en la evaluación de la calidad o pureza genética en materiales mejorados es el uso de marcadores moleculares ISSR, se basa en el uso de un iniciador compuesto de una secuencia de microsatélite anclado al extremo 3´ o 5´ por 2-4 nucleótidos arbitrarios. En el cual se obtienen bandas que van de 100 a 2000 pares de bases (pb). La variación alélica en los ISSRs consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados. Es un marcador dominante el cual genera de 25 a 50 bandas en una sola reacción (Dequi *et al*., 1998; Zietkiewicz *et al.*, 1994).

1.3. HIPÓTESIS

La generación F1 mantendrá las características agronómicas de los parentales de chile Dulce y chile X´catik.

La pureza genética de los híbridos estará determinada por la conformación genética de los genotipos parentales.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1 GENERAL

Caracterizar agronómica y molecularmente los híbridos F1 originados a partir de la cruza directa y recíproca de chile Dulce x chile X´catik.

1.4.2 ESPECIFICOS

Caracterizar agronómicamente las plantas de los híbridos (F1) y compararlos con sus progenitores (chile Dulce y chile X´catik).

Evaluar los caracteres fenotípicos de los híbridos F1

Evaluar la estructura genética de los híbridos F1 y sus parentales.

1.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Ubicación

Etapa I

Siembra de Genotipos parentales

Dulce

X´catik

Generación de las cruzas directas y reciprocas

Parental Dulce ⇄ **Parental X´catik**

Siembra de híbridos F1

Hibrido 1
Dul x Xcat

Hibrido 2
Xcat x Dul

Análisis de datos

Etapa II

Extracción de ADN y caracterización molecular de los parentales

Extracción de ADN, amplificación por PCR, caracterización molecular y morfológica de los

Análisis de datos

1.6. LITERATURA CITADA

Aguilar, R. V., T. Corono, T., P. López L., L. Latournerie, M., M. Ramírez, M., H. Villalón, M. y A. Aguilar, C. 2010. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Posgraduados, INIFAP, IT de Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.

Ayala, A. B., J. Mejía, C., I. Martínez, E., M. Rubí, A., L. Vázquez, G. 2017. Caracterización morfológica de híbridos de chile manzano. Estado de México, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, pp. 825-836

Bartón, H. N. 2001. The role of hybridization in evolution. Molecular ecology. p 551 - 568.

Berretta, A., A. Albín, R. D. y P. Gómez. 2010. Recursos fitogenéticos: desafíos y oportunidades. En: Estrategias en los recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Uruguay, Montevideo, pp: 7-20.

Bosland, P. W. 1996. Capsicum: Innovative uses of an ancient crop. In J. Janick (Ed.), Progress in new crop pp. 479 - 489. Arlington, VA,: ASHS press.

Bosland, P. W. and J. Vostava, E. 2000. Peppers: vegetable and spice Capsicums. CABI Publishing, New York, USA. 229 p.

Bosland, P.w. 1994. Chiles: history, cultivation, and uses. In: Charalambous, G. ed. Spices, herbs and edible fungi. Charalambous ed. pp. 347-366.

Bobadilla, L. V., E. Esparza, I., L. Delgadillo, R., P. Gallegos, F., J. Ayala, L.2017. Variedades de chile (*Capsicum annuum* L.) identificadas mediante marcadores RAPD. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México Tropical and Subtropical Agroecosystems, 20 (2017): 465 - 473

Depestre T., O. Gómez., and J. Espinosa. 1985. Genetic parameters in pepper (Capsicum annuum). Capsicum & Eggplant Newsletter. Italia, 4: 28.

Elizondo C., E. y J. Monge, P. 2016. Caracterización morfológica de 12 genotipos de chile dulce (*Capsicum annuum* L.) cultivados en invernadero en Costa Rica. Tecnología en Marcha. 29:3. pp. 60-72.

González M. y W. Bosland, P. 1991. Germoplasma de capsicum en las Américas. Diversiy 7:1-2. pp. 57-59.

González, E. T., C. Casanova, C., L. Gutiérrez, P., L. Torres, T., F. Contreras, M., S. Peraza, S. 2010. Chiles cultivados en Yucatán. En: Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. R. Durán y M. Méndez (Eds.). CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. 496 p.

González, G. M., M. Medina H., M. Medina H., G. Palomares H. 2010. Identificación y selección de marcadores moleculares Inter-microsatelite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annuum* L.

Ix-Nahuat, J. G., L. Latournerie, M., M. Pech, May, A. Pérez, G., M. Tun, S. J., G. Ayora, R., O. Mijangos, C. J., G. Castañón, N., S. López, V. J., S. Montes, H. 2013. Valor agronómico de germoplasma de chile dulce (*Capsicum annuum* L.) en Yucatán, México. Universidad y Ciencia. Tróp. Húmedo, 29:3, pp 231-242.

IPGRI., 2003. Descriptores para Capsicum (Capsicum spp.) 16: CATIE.

Latournerie, M. L., L. Chávez, J., M. Pérez, P., F. Hernández C., C., R. Marínez, V., M. Arias R., L., y G. Castañón, N. 2001. Exploración de la diversidad morfológica de chiles regionales en Yaxcabá, Yucatán, México. Agron. Mesoam., 12:1. pp. 41-47.

Latournerie, M. L., J. L. Chávez, S., M. Pérez, P., G. Castañón, N., S. A. Rodríguez, H., L. M. Arias, R., P. Ramírez, V. (2002) Valoración in situ de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Revista Fitotecnia Mexicana 25:25-33.

Lanteri, S., A. Acquadro., L. Quagliotti., E. Portis., 2003. RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (Capsicum annuum L.), grown in North-West Italy. Genetic Resources and Crop Evolution, 50:7. pp 723-735.

López, C. L., R. Garruña, H., C. Castillo, A., A. Martinez, H., M. Ortiz, G., R. Adueza, N. 2019. Structure and Genetic Diversity of Nine Important Landraces of Capsicum Species Cultivated in the Yucatan Peninsula, Mexico. Agronomy

Pickersgill, B. 1997. Genetic resources and breeding of Capsicum spp. Euphytica. 96:1. pp. 129-133.

Pozo, CO., HS. Montes y JE. Redondo. 1991. Chile (*Capsicum* spp.) In: Ortega PR, Palomino HG, Castillo GF, González HVA, Livera MM (Ed.). Avances en el estudio de los recursos togenéticos en México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México. pp. 217 - 238.

Pickersgill, B. Recursos genéticos y reproducción de Capsicum spp. Euphytica. 1997. 96: pp 129-133.

Scaldaferro M, Barboza GE, Acosta MC. Historia evolutiva del chile Capsicum baccatum L. (Solanaceae): domesticación en América del Sur y diversificación natural en los bosques tropicales estacionalmente secos. Biol J Linnean Soc. 2018.124: pp. 466–478.

Terán, S., C. H. Rasmussen y O. May C. 1998. Las plantas de la milpa entre los mayas. Yucatán, México. pp: 193-201.

Trujillo Aguirre, J. J. G., R. Pérez-Llanes, C., O. Gutiérrez, A. 2005. Avances en la caracterización fenológica de genotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) criollos e introducidos en Yucatán, México. Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca. Mérida, Yuc. pp: 269-272.

II. CAPITULO 2. CARACTERIZACIÓN DEL CHILE BOBO: HÍBRIDO PROVENIENTE DE CRUZAS DIRECTAS Y RECÍPROCAS DE CHILE DULCE X X´CATIK (*Capsicum annuum* L.)

Manuel **J. Hernández-Pinto**[1*], René **Garruña**[2*], Rubén **H. Andueza-Noh**[2], Luís **Latournerie-Moreno**[1], Javier **O. Mijangos-Cortés**[3]

[1] *División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Conkal. Av. Tecnológico s/n. CP. 97345, Conkal, Yucatán, México.*
[2] *CONACYT-Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Conkal. Av. Tecnológico s/n. CP. 97345, Conkal, Yucatán, México.*

[3]*Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, CP. 97205, Mérida, Yucatán, México.*

2.1. RESUMEN

En Yucatán los genotipos de chiles Dulce e X´catik son ampliamente apreciados por su sabor y aroma. Son utilizados en la cocina regional y son sembrados todo el año. En las parcelas de estos genotipos es común cosechar frutos con un morfotipo diferente, a estos comúnmente le llaman chile bobo. El chile bobo es una cruza natural azarosa que se produce cuando se cruzan los genotipos de chile Dulce e X´catik creando un híbrido. Sin embargo, se desconoce la dirección de la cruza, así como sus características agronómicas. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar molecular y fenotípicamente dos morfotipos de chile bobo (*C. annuum*) y compararlo con sus progenitores (chile Dulce y chile X´catik). Se realizaron cruzas directas y reciprocas, se generaron dos híbridos H1 (Dulce * X´catik) y H2 (X´catik * Dulce). Se evaluaron los parentales (chile X´catik y Dulce) y los dos híbridos (H1= dul * xcat y H2= xcat * dul). En las variables de fruto se registró la mayor longitud (15 cm) en el chile X´catik en comparación con los híbridos H1 y H2 (11 y 10 cm, respectivamente) y con el chile Dulce que tuvo los frutos con menor longitud (7 cm). En el diámetro los H1 y H2 registraron valores intermedios a sus progenitores. En el rendimiento los parentales X´catik y Dulce tuvieron rendimientos similares al H2. En cuanto a las variables cualitativas el chile X´catik presentó frutos de color amarillo claro antes de la maduración, mientras que en los demás genotipos son de color verde (medio), la posición de

los frutos es pendiente en todos los materiales, con una forma triangular estrecha en el X´catik, cuadrada en el chile Dulce y rectangular en los híbridos.

Los análisis de pureza genética en los genotipos híbridos H1 y H2 provenientes de los progenitores X´catik y Dulce, presentaron patrones de amplificación 100% iguales a sus progenitores manteniendo así el 100% de pureza genética. El chile bobo es un híbrido con un potencial productivo poco aprovechado.

2.2. INTRODUCCIÓN

En México existen un gran número de poblaciones domesticadas y silvestres que representan una variabilidad genética y morfológica que constituyen un reservorio de genes que pueden ser utilizados en el mejoramiento genético (Rodríguez *et al*., 2007; Hernández, 2011). En la península de Yucatán sobresalen dos genotipos de *C. annuum*, i) el chile Dulce y ii) el chile X´catik. Estos genotipos son ampliamente apreciados por tener poco picor, sabor y aroma muy particular, distinto al resto de los chiles en el país (Cázares y Duch, 2002). El chile Dulce también es conocido como ch'uhuk ik, ch'ujuk iik, xwoolis y xts'a'ay iik (Terán *et al*., 1998), su fruto es de forma redonda con hendiduras irregulares, de color verde en estado inmaduro y rojo en estado maduro, y presenta de 2 a 4 lóculos (Velasco-Morales, 2003), no pica, pues no tiene capsaicinoides y es ampliamente utilizado en la cocina regional de Yucatán. El chile X´catik cuyo nombre maya se traduce como chile rubio o güero (Velasco-Morales, 2003), las plantas de este genotipo alcanzan una altura de 35 a 70 cm, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se siembre, el color de la hoja presenta diversas tonalidades (verde oscuro a verde claro), el fruto inmaduro es de color amarillo pálido, delgado, puntiagudo, de forma cónica alargada y algo ondulado, al madurar se torna de color naranja o rojo, su escala de pungencia puede ir de moderadamente picoso a muy picoso (Pickersgill, 1971), este chile se consume fresco, asado, entero y sin pelar, es un ingrediente importante de guisos regionales. Estos dos genotipos de chile alcanzan precios muy elevados casi todo el año, ya que son usados para la comida típica regional y también son procesados.

Los productores suelen sembrar estos dos genotipos en las mismas parcelas de producción, es común cosechar frutos dentro de estas parcelas con un morfotipo diferente tanto al chile

dulce como al X´catik, a este morfotipo diferente le llaman chile bobo. El chile bobo es una cruza azarosa que se produce cuando de manera natural se cruzan los gametos sexuales de del chile dulce y el X´catik, a lo cual se genera un híbrido (chile bobo). Anteriormente, los productores de chile tiraban los frutos de chile bobo, pero recientemente se comenzó a comercializar como condimento en platillos típicos de la península de Yucatán, debido a que tiene un sabor idéntico al del chile X´catik y un precio más bajo. En este sentido, el chile bobo es un híbrido con un potencial productivo poco aprovechado. Por otra parte, la hibridación constituye una herramienta adecuada para el análisis de la segregación de caracteres e incluye efectos como el incremento de variación genética intraespecífica, origen y transferencia de variaciones genéticas, el origen de nuevos ecotipos y el reforzamiento o rompimiento de barreras reproductivas (Ayala *et al.* 2017). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar molecular y fenotípicamente dos morfotipos del híbrido chile bobo (*C. annuum*) y compararlo con las características de sus progenitores (chile Dulce y X´catik).

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal parental y cruzas para generar los híbridos

El trabajo experimental se desarrolló en el área de invernaderos del Instituto Tecnológico de Conkal, en Yucatán, México. Se utilizaron semillas de dos genotipos de *Capsicum annum* L. (chile Dulce y chile X´catik). Se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades, se utilizó como sustrato musgo canadiense (SunGro, Vancouver, Canadá). Una vez que las plántulas emergieron se regaron cada tercer día y 17 días después de la siembra (dds) se inició la fertilización foliar (19:19:19 de N:P:K, 1g L^{-1}) (Garruña-Hernández *et al.*, 2014).

El trasplante se realizó a los 35 dds, las plantas se colocaron dentro de un invernadero con ventana cenital, en camas de siembra con distancias de 1.50 m entre filas y 0.60 m entre plantas. El manejo agronómico se realizó de acuerdo con Soria *et al*. (2002). El número total de plantas fue de 400 por genotipo, se seleccionaron 10 plantas por genotipo y cuando alcanzaron la floración se hicieron las cruzas directas y reciprocas para obtener los híbridos F1: chile dulce x chile x´catik (dul*xcat= H1) y chile x´catik x chile dulce (xcat*dul= H2). La emasculación se hizo en la flor receptora, en preantesis, con anteras inmaduras que se

desprendieron manualmente cuando los botones florales presentaron en su parte superior la coloración de los pétalos, en esta etapa el estilo y el estigma están a la altura de las anteras y son un indicador de receptibilidad. Por otra parte, los progenitores masculinos (donantes) fueron de flores del día que presentaron antesis con abundante polen de color cremoso e hidratado, se polinizó mediante fricción de las anteras de la flor donante sobre el estigma de la flor receptora (Figura 1). Las flores polinizadas manualmente fueron etiquetadas y cubiertas con bolsas de papel por 72 h para evitar contaminación con polen no deseado (Sánchez et al., 2010). Además, se retiraron las flores cercanas para evitar polinización no deseada. Se realizaron 111 cruzas de Dulce*X´catik (morfotipo del H1), 126 de X´catik*Dulce (morfotipo del H2) y 30 de autofecundación como control. Se consideró una fecundación exitosa cuando se observó desarrollo del ovario a los 10 días después de la polinización y amarre del fruto.

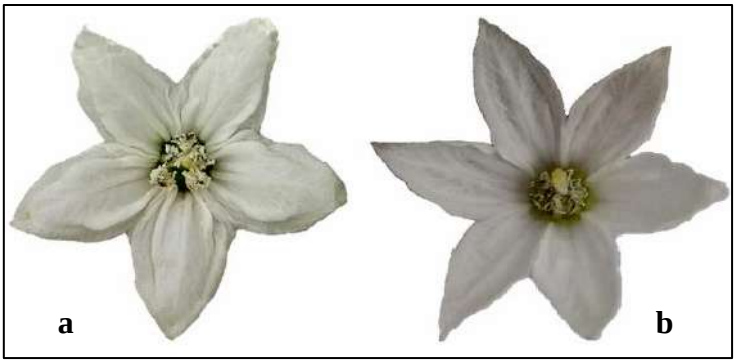

Figura 1. Flor abierta y madura de plantas de dos genotipos de *Capsicum annuum*, chile Dulce (a) y chile X´catik (b).

2.3.2. Siembra de parentales e híbridos

La siempre de parentales e híbridos se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades, una vez que las plántulas empezaron a emerger se contabilizó emergencia y supervivencia. El trasplante se realizó a los 35 días después de la siembra (dds), las plantas se colocaron en camas de 1.50 m entre fila y 0.60 m entre plantas, se sembraron 400 plantas de x´catik y 400 de dulce (genotipos parentales). En el caso de los híbridos se establecieron dos parcelas por separado donde se sembraron 200 plantas del H1 y 200 del H2, las semillas de los híbridos

se generaron mediante las cruzas directas y reciprocas. La fertilización se realizó con base a la solución nutritiva de Steiner, al 25% los primeros 20 ddt, al 50% los siguientes 30 días y posteriormente al 100%.

2.3.3. Evaluación morfológica de híbridos y parentales

La descripción morfológica de progenitores e híbridos se realizó de acuerdo con el SNICS (2014), con 51 descriptores morfológicos (39 caracteres cualitativos y 13 caracteres cuantitativos). Se comenzó a evaluar cuando el 50% de las plantas presentaron frutos maduros. Para planta se midieron hábito de crecimiento, longitud de tallo, entrenudos acortados, color de antocianinas en los nudos y pubescencia en tallo. Para hoja se midieron forma, longitud, anchura, color, margen, pubescencia y longitud del peciolo. Para flor se midieron posición, color de las anteras, color del filamento, color antes de la maduración, intensidad del color antes de la madurez, posición, longitud, diámetro, forma, forma de sección transversal, ondulación transversal, color en maduración, brillantez, cavidad peduncular, forma del ápice, textura, grosor del pericarpio, sabor, contenido de capsaicina en la placenta, posición de la placenta, longitud y grosor del pedúnculo, aspecto y margen del cáliz, tiempo de inicio de madurez.

2.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Los cuatro genotipos se evaluaron bajo un diseño experimental completamente al azar, con 10 repeticiones, la unidad experimental consistió en 10 plantas elegidas al azar por cada genotipo. Los datos de las variables evaluadas se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS Statistics 2.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p \leq 0.05$) y al encontrar diferencias significativas se realizó comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$).

2.3.5. Evaluación molecular

Para la extracción de ADN se evaluaron 10 plantas de cada genotipo (2 parentales y 2 híbridos). El ADN genómico se extrajo tomando dos hojas jóvenes por individuo, con el kit de extracción de ADN para plantas (plant mini kit DNeasy, Qiagen, USA, CA, Valencia). La calidad de ADN se verificó por electroforesis, en geles de agarosa al 1%, teñido con 2 µl de Uview 6x loading dye (bioRad, USA, CA, Berkeley) en una solución de buffer TAE al 1.0x. La cantidad de ADN se cuantificó con espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scien tific, USA, Waltham, MA).

La Amplificación de PCR se realizó con 9 de 10 iniciadores Inter Secuencias Simples Repetidas ISSR (Cuadro 1), que han mostrado buenos resultados de amplificación y altos niveles de polimorfismo en *Capsicum* spp. (Yao *et al.* 2008, Días *et al.* 2013). Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 20 µl conteniendo: 10 µl de iTaq DNA Universal SYBR Green Super Mix, 2 µl de iniciador ISSR, 1 µl de ADN de cada muestra, suspendido en 7 µl de agua ultra pura. Los ciclos de amplificación fueron corridos en un termociclador BioRad (C1000Touch) programado para 4 min. A 94 °C de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos a 94ºC durante 2 min, 1.5 min., de alineamiento con el rango de temperaturas de 54 a 52 °C dependiendo del iniciador usado, 1 min., a 72ºC y un periodo de extensión final de 7 min. a 12ºC.

Cuadro 1. v Iniciadores Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) utilizados en los genotipos de *C. annuum.*

Nº	**Primer code**	**Secuencia (5´- 3´)**
1	TACA (GCA) 3G	TACA GCA GCA GCA G
2	(GC) 2CGCCGCCGCC	GC GC CG CC GC CG CC
3	CTC(GT)8	CTC GT GT GT GT GT GT GT GT
4	(CA)6GG	CA CA CA CA CA CA GG
5	UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
6	UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
7	UBC 827	ACA CAC ACA ACA ACA CG
8	UBC 828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
9	UBC 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa (UltraPureTMAgarose, INVITROGEN) al 1%, teñidos con 2 µl de buffer de reacción (Uview 6x loading dye de la marca BioRad), en una solución amortiguadora TAE 1X. Utilizando una cámara de electroforesis horizontal a 90 vols constante durante 50 minutos y un marcador de peso molecular de un 1kb como referencia para las lecturas. La visualización de los fragmentos se realizó en un foto-documentador Gel Doc EZ Imager, de la marca BioRad. Para la interpretación de los resultados cada banda ISSR fue considerada como un locus independiente y las bandas polimórficas (alelos) fueron registradas como presencia (1) o ausencia (0) para todas las muestras.

El análisis de la pureza genética de los genotipos parentales e híbridos. Se realizó con diferentes programas de análisis genéticos: para el análisis de perfil genético obtenido en los geles de agarosa al 1%, tomando en cuenta el perfil de amplificación y el tamaño de los fragmentos amplificados. se realizó una prueba de ancestría con el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard et *al.*, 2000), usando el modelo de ancestría mezclado con frecuencias alélicas correlacionadas. Este programa opera bajo un enfoque de agrupamiento bayesiano con el método de cadenas de Marcov Monte Carlo (MCMC), y con base en sus frecuencias alélicas los individuos en la muestra son asignados probabilísticamente a un grupo o a dos grupos diferentes en caso de ser individuos que comparten características genotípicas (individuos mezclados genéticamente). Posteriormente, se analizaron las relaciones genéticas bajo el método UPGMA, utilizando el coeficiente de similitud de Dice.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Caracteres morfológicos

En la emergencia total no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos (Figura 2a). Sin embargo, las plántulas del H2 emergieron más rápido (58 plántulas día^{-1}) que el parental X´catik (42 plántulas día^{-1}) (Figura 2c). En la emergencia acumulada los híbridos H1 y H2 alcanzaron su valor más alto (95 y 97%, respectivamente) a los 2 dds, mientras que los parentales (chile X´catik y Dulce) pasaron el 90 % de la emergencia un día después (Figura 2d). Por otra parte, la semilla de chile dulce fue la más pesada (0.75 g, peso de 100 semillas), superó estadísticamente al resto de los tratamientos (Figura 2b).

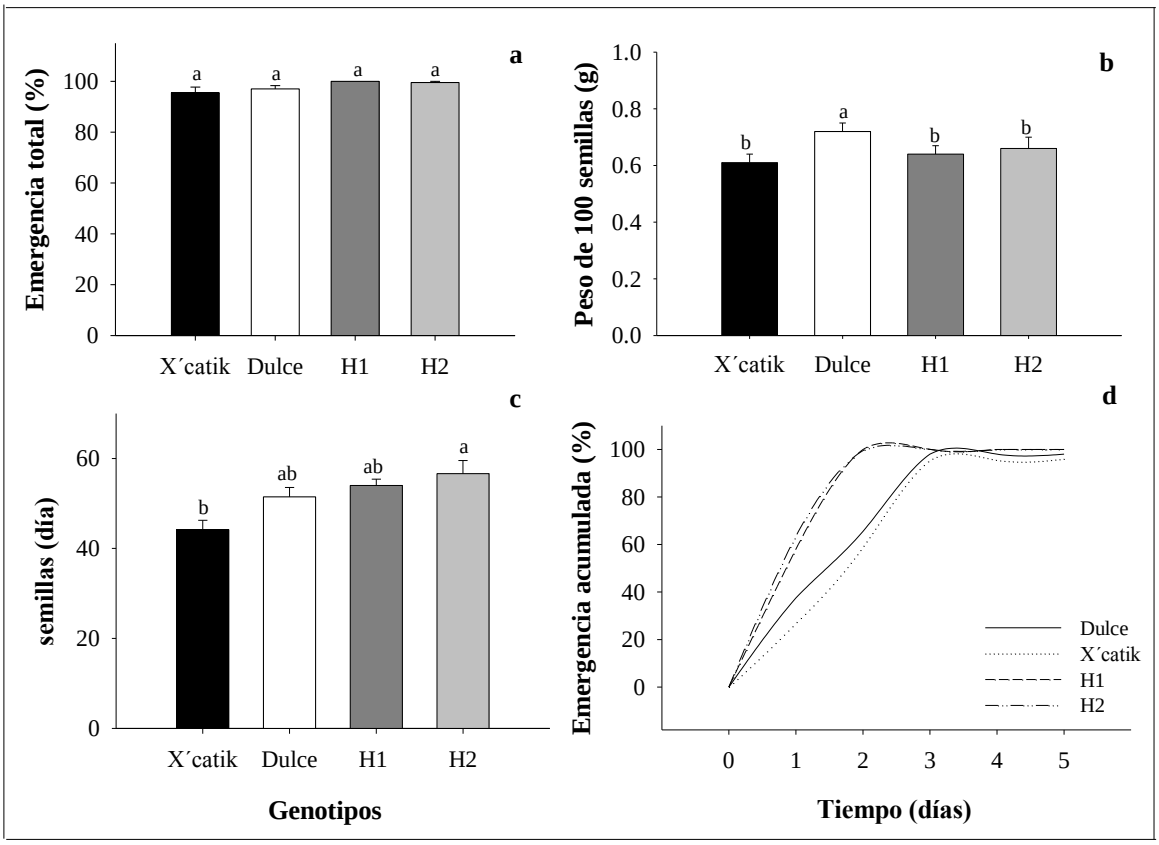

Figura 2. Emergencia de plántulas de genotipos de *C. annuum.* a) porcentaje de emergencia, b) peso de 100 semillas, c) tasa de emergencia y d) emergencia acumulada.

En las cruzas de los parentales, cuando el chile X´catik fue receptor y el chile Dulce fue donante se obtuvo el mayor porcentaje de prendimiento (36.5%), estadísticamente superior a las cruzas donde el chile Dulce fue receptor y el chile X´catik fue donante (28%) (Cuadro 2). En el porcentaje de aborto no hubo diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2). Esto sugiera que el chile Dulce tiene un efecto materno positivo en la hibridación. En este sentido, Rêgo *et al*. (2009) indican efectos maternos en cruzas directas y recíprocas obtenidos con 8 progenitores de *Capsicum*. El aborto de las cruzas se puede atribuir a la temporada en que se realizó la emasculación (otoño-invierno) en el cual el contenido de humedad es mayor que la temporada primavera-verano. Tal como lo menciona George (1999) quien indica que el prendimiento en la autopolinización y el aborto de flores del género *Capsicum* están influenciadas por el ambiente.

Cuadro 2. Prendimiento y aborto de flores polinizadas manualmente por cruzas directas e indirectas entre dos genotipos progenitores de *C. annuum.*

Cruzas	Variables		
	Prendimiento	Aborto	Total
Dulce * x´catik	31 (28%) b	80 (72%) a	111 (100%)
X´catik * dulce	46 (36%) a	80 (63%) a	126 (100%)

Los datos son medias, valores con diferentes literales indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

En los caracteres cualitativos (Cuadro 3) se observó que los genotipos comparten rasgos comunes. Los híbridos (H1 y H2) presentaron características fenológicas similares a los progenitores. La posición de la flor fue intermedia en el chile dulce y pendiente en los demás genotipos, el color de las anteras fue morado para todos los materiales y el filamento presentó una pigmentación blanca, la excerción del estigma fue exerto y no se presentó esterilidad masculina. Lo cual concuerda con lo reportado por Smith y Heiser (1951) quienes mencionan que el color de las flores es blanco o amarillo claro con anteras moradas, de crecimiento intermedio y de escasa pubescencia. De la misma manera, Berke (2000) y Barrios *et al*.

(2007) indican que cuando el estigma es exerto aumenta el porcentaje de polinización cruzada, lo cual ocurre de manera natural en el cruzamiento de chile dulce y chile X´catik y favorece la formación de nuevas variantes o híbridos (Latournerie 2001). Es probable que esta característica sea clave en el alto índice de cruzamiento que se da de manera natural cuando los productores siembran en la misma parcela el chile Dulce y el chile X´catik, lo que ocasiona que en un siguiente ciclo aparezca un porcentaje considerable de plantas con chile bobo en lugar de los parentales.

Cuadro 3. Caracteres cualitativos de flor de progenitores e híbridos F1 de cruzas directas y recíprocas.

Flor			**Parentales**		**F1**	
Descriptor	Categoría		Dulce	X´catik	H1	H2
Posición	Erecta	3	5	7	7	7
	Intermedia	5				
	Pendiente	7				
Color de anteras	Blancas	1	3	3	3	3
	Amarillas	2				
	Moradas	3				
Color de filamento	Blanco	1	1	1	1	1
	Amarillo	2				
	Morado	3				
Exerción del estigma	Inserto	3	7	7	7	7
	Al mismo nivel	5				
	Exerto	7				
Esterilidad masculina	Ausente	1	1	1	1	1
	Presente	9				

En la altura de la planta el parental chile X´catik obtuvo la mayor altura 82 cm, estadísticamente superior (46 %) al hibrido H2 (45 cm), los demás genotipos fueron estadísticamente similares entre ellos. De la misma manera, en el diámetro del tallo el chile X´catik registró el mayor valor 17.5 mm superior a todos los genotipos, sin embargo, el chile Dulce fue superior en 46.2 % (13 mm) a los híbridos, los cuales obtuvieron valores similares entre ellos (7 y 8 mm respectivamente). Lo cual coincide con lo reportado por Campos (2009) quien obtuvo en chile Dulce un promedio en la altura de la planta entre 0,40 y 2,24 m. En la longitud del tallo el híbrido H1 fue estadísticamente superior (29 cm) a todos los tratamientos,

los parentales y el híbrido H2 fueron similares entre sí. El chile X´catik y chile Dulce tuvieron la mayor longitud del entrenudo (7 y 8 cm respectivamente), mientras que los híbridos registraron valores similares (Figura 3).

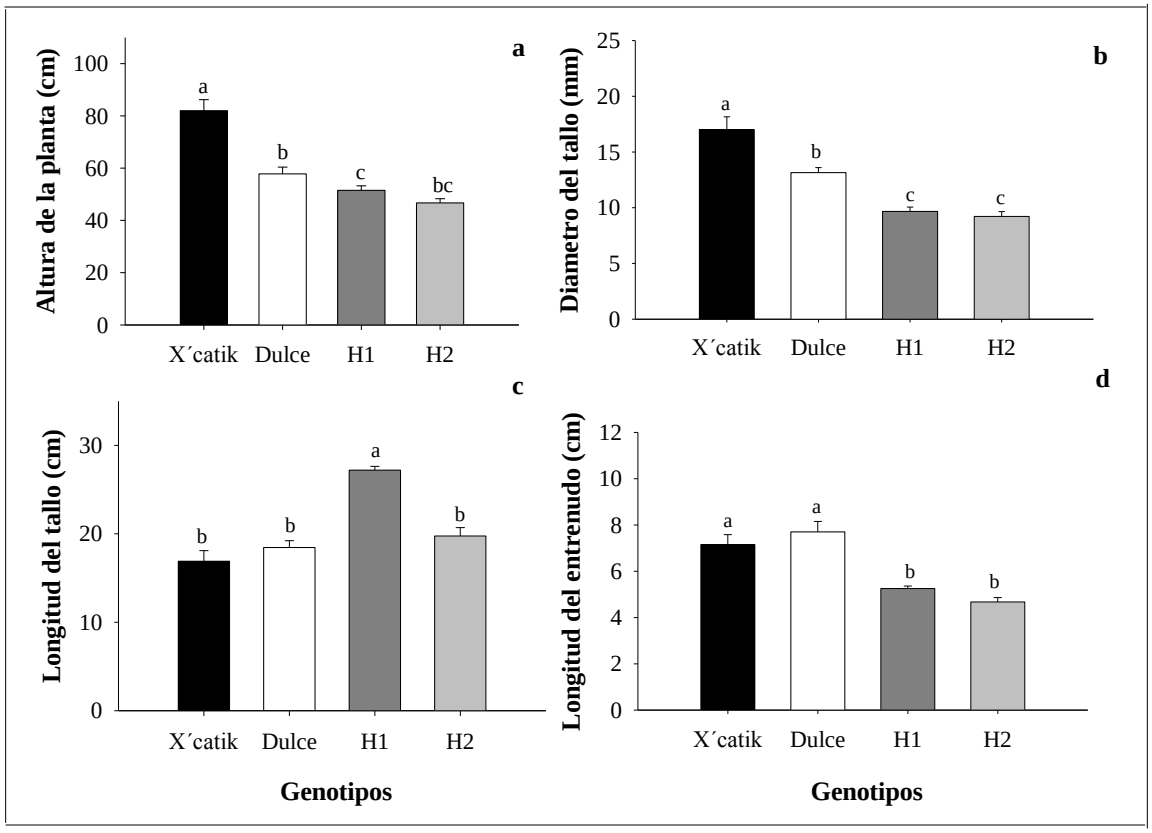

Figura 3. Caracteres agronómicos de planta en progenitores e híbridos F1 de chile *C. annuum* cultivados en Yucatán, México. Los datos son medias, los valores con literal diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Con respecto a las variables cualitativas de la planta todos los genotipos presentaron coloración del hipocótilo, con excepción del chile X´catik el resto de los materiales presentaron un hábito de crecimiento erecto, es probable que por el tamaño de los frutos las plantas de X´catik tuvieron un hábito de crecimiento semierecto. El crecimiento basal se encontró únicamente en los parentales (Cuadro 4). En general todos los genotipos presentaron más de tres entrenudos acortados, la presencia de antocianinas fue de débil a medio. Con excepción del híbrido que expresó tallo pubescente denso, los demás genotipos tuvieron una presencia media. Lo cual es similar a lo reportado por López y Castro (1999) quienes

mencionan que la densidad de ramificación es intermedia y que está relacionada con su hábito de crecimiento erecto y semierecto.

Cuadro 4. Caracteres cualitativos en planta de progenitores e híbridos F1 de cruzas directas y recíprocas

Planta			**Parentales**		**F1**	
Descriptor	Categoría		Dulce	X´catik	H1	H2
Coloración Antociánica del hipocótilo	Ausente Presente	1 9	9	9	9	9
Hábito de crecimiento	Erecta Semierecta Postrada	3 5 7	3	5	3	3
Hábito de crecimiento	Basal Dicotómica Otra	1 2 3	1	1	3	3
Entrenudos acortados	Ausente Presente	1 9	9	9	9	9
Número de entrenudos	De uno a tres Mas de tres	1 2	2	2	2	2
Color de antocianinas en el nivel de los nudos	Ausente/débil Débil Medio Fuerte	1 3 5 7	3	5	5	5
Tallo pubescencia	Escasa Intermedia Densa	3 5 7	5	5	7	5

El chile Dulce y el híbrido H1 tuvieron hojas con longitud superior (12 y 11 cm, respectivamente) al chile X´catik y al híbrido H2 (10 y 9 cm, respectivamente) (Figura 4a). En el ancho de la hoja se observó la misma tendencia, el chile dulce y el hibrido H1 superaron a los demás genotipos (Figura 4b). En la longitud del peciolo el hibrido H2 fue estadísticamente inferior al resto de los genotipos (Figura 4c).

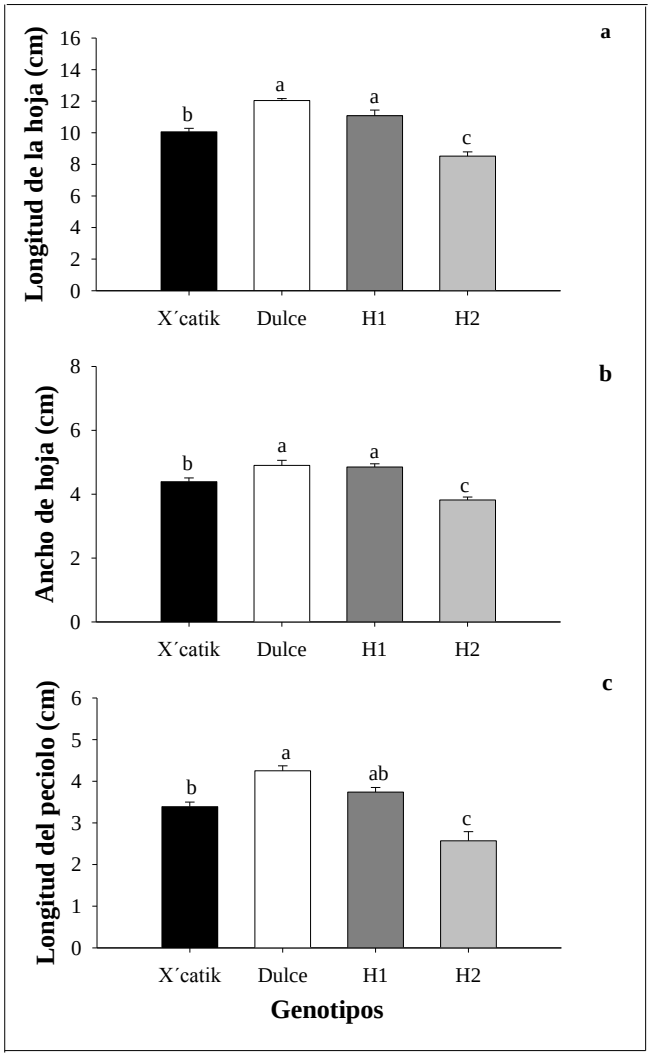

Figura 4. Caracteres agronómicos de hoja en progenitores e híbridos F1 de chile *C. annuum* sembrados en Yucatán, México. Los datos son medias, literales diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, α = 0.05).

El chile X´catik registró la mayor longitud de fruto (15 cm) en comparación con los híbridos H1 y H2 (11 y 10 cm, respectivamente) y con el chile Dulce que tuvo los frutos con menor longitud (7 cm) (Figura 5a). Así mismo, el chile X´catik presentó el mayor grosor del pericarpio (2.8 mm) estadísticamente superior a los demás materiales (Figura 5b). Sin embargo, en el diámetro del fruto el chile dulce obtuvo el mayor valor (6.1 cm) superior al resto de los genotipos (Figura 5c). Por otra parte, los parentales (X´catik:1750 y Dulce: 1700 g/planta) tuvieron rendimientos similares al híbrido H2 (1650), pero superiores

estadísticamente al híbrido H1 (1530) (Figura 5d). En este sentido, Chávez y Castillo (1999) indican que el rendimiento está influenciado por características heredables y el ambiente.

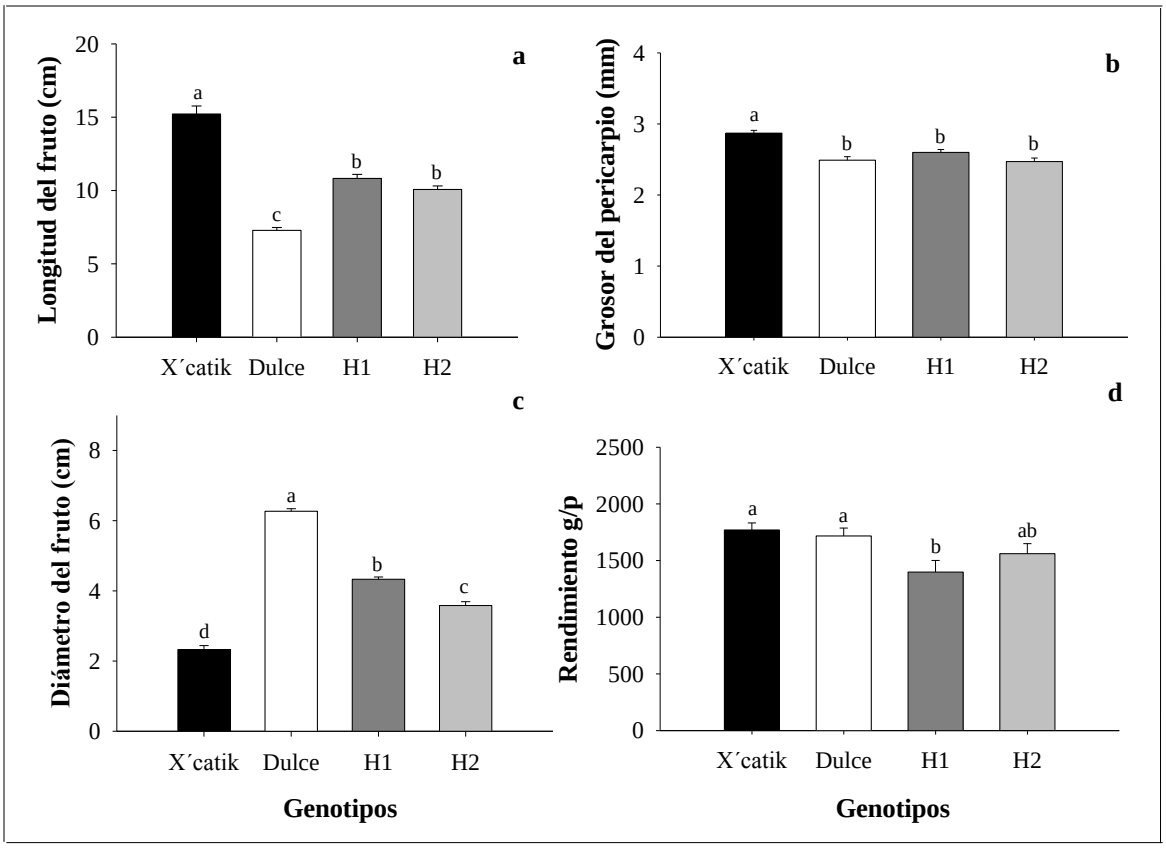

Figura 5. Caracteres agronómicos de fruto en progenitores e híbridos F1 de chile *C. annuum* sembrados en Yucatán, México.

El chile X´catik presentó frutos de color amarillo claro antes de la maduración, mientras que en los demás genotipos son de color verde (medio), la posición de los frutos es pendiente en todos los materiales, con una forma triangular estrecha en el X´catik, cuadrada en el chile Dulce y rectangular en los híbridos (H1 y H2), la sección transversal es angular con ondulación débil en chile X´catik, fuerte en chile Dulce y media en los híbridos. Los frutos maduros son de color rojo con una intensidad media y media brillante para todos los genotipos. La cavidad peduncular únicamente se observó en el chile Dulce. La forma del ápice fue aguda en el parental X´catik, hundido en el chile Dulce y el híbrido H1, hundido y agudo en el híbrido H2. La textura de los frutos es lisa en todos los materiales, de un solo

lóculo en el X´catik y de tres a cuatro en los otros genotipos. Con excepción del chile Dulce los demás genotipos presentaron pungencia. La placenta, presento una posición compacta en el parental dulce y semidistribuida en los demás. Sólo el chile Dulce no desarrolló el aspecto del cáliz y su margen es entero (Cuadro 5). En general los híbridos presentaron características de fruto más similares al parental X´catik.

Cuadro 5. Caracteres cualitativos en fruto de progenitores e híbridos F1 de cruzas directas y recíprocas.

Fruto			**Parentales**		**Híbridos F1**	
Descriptor	Categoría		X´catik	Dulce	H1	H2
Color antes de madurez	Amarillento	2	2	3	3	3
	Verde	3				
	Púrpura	4				
Intensidad del color antes de madurez	Claro	3	3	5	5	3
	Medio	5				
	Oscuro	7				
Posición	Erecta	1	3	3	3	3
	Horizontal	2				
	Pendiente	3				
Forma	Cuadrada	4	8	4	5	5
	Rectangular	5				
	Triangular	7				
	Triangular estrecha	8				
forma de la sección transversal	Elíptica	1	2	2	2	2
	Angular	2				
	Circular	3				
Ondulación transversal	Débil	1	1	3	2	2
	Media	2				
	Fuerte	3				
Color en madurez	Amarillo	1	3	3	3	3
	Naranja	2				
	Rojo	3				
Intensidad del color en madurez	Claro	3	4	4	4	4
	Medio	4				
	Oscuro	7				
Brillantez	Débil	3	5	5	5	5
	Media	5				
	Fuerte	7				
Cavidad peduncular	Ausente	1	1	9	1	1
	Presente	9				

Forma del ápice	Agudo Hundido Hundido y agudo	1 2 3	1	2	2	3
Textura	Liso Corchoso Rugoso	1 2 3	1	1	1	1
Número predominante de lóculos	Dos a tres Tres a cuatro Cuatro o mas	1 2 3	1	2	2	2
Sabor	Dulce Pungente	1 2	2	1	2	2
Contenido de capsaicina en la placenta	Presente Ausente	1 9	1	9	1	1
Posición de la placenta	Compacta Semidistribuida Distribuida	3 5 7	7	3	7	7
Aspecto del cáliz	No desarrollado desarrollado	1 2	2	1	2	2
Margen del cáliz	Entero Intermedio Dentado	1 2 3	3	1	3	3

En general la variación en los resultados de las características cualitativas y cuantitativas puede atribuirse a las respuestas fenotípicas expresadas por el ambiente y por la herencia genética por parte de los parentales. En este sentido, Raven *et al.* (2005) indican que en la descripción morfológica puede estar influenciada por el ambiente.

2.4.2. Caracterización molecular

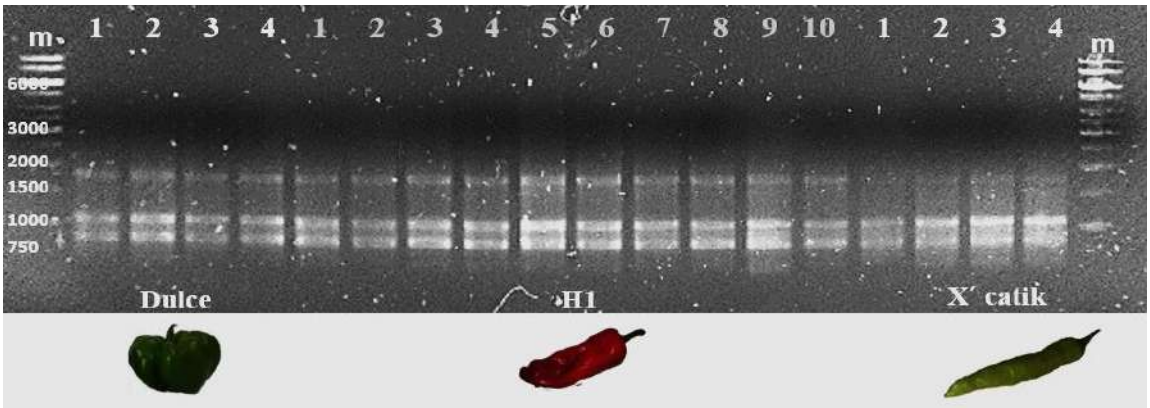

Figura 6. Perfil genético de 10 individuos del hibrido H1 con sus parentales M=marcador de peso molecular, pb= tamaño en pares de bases, Carriles 1,2,3 y 4 en color blanco perfil genético de los parentales.

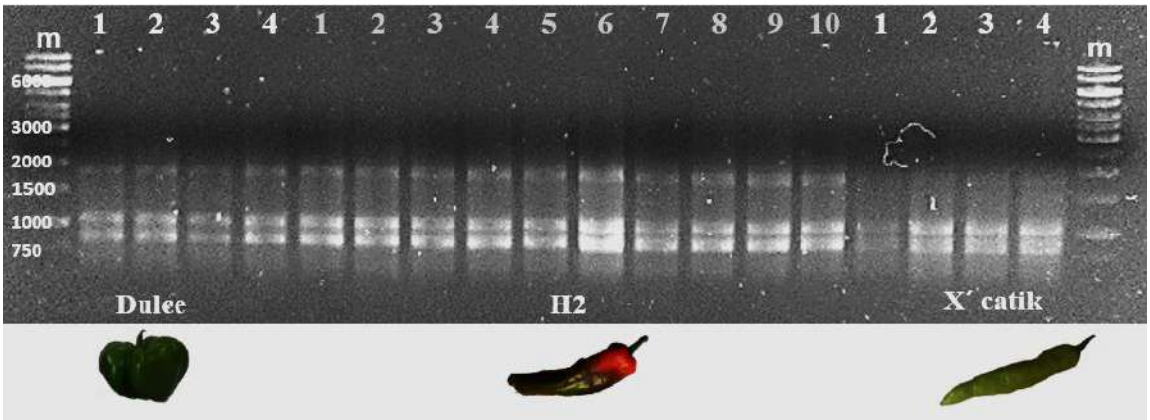

Figura 7. Perfil genético de 10 individuos del hibrido H2 con sus parentales M= marcador de peso molecular, pb= tamaño en pares de bases, Carriles 1,2,3 y 4 en color blanco perfil genético de los parentales.

El perfil genético obtenido con los nueve primers ISSR evaluados en los cuatro genotipos, mostró una similitud de los híbridos con los parentales. Los loci se encontraron en un rango de 300 a 2500 pb (Figura 6 y 7). Superior a lo reportado por López-Espinosa *et al.*, (2018) quienes reportan loci en un rango de 300 a 1500 pb en *Capsicum chinense.* La variación

observada en la expresión del perfil genético, entre los resultados de este estudio y lo reportado por López-Espinosa *et al.*, (2018) puede deberse a diferentes factores como son: el número de muestras analizadas, el número de primers evaluados, el origen de las muestras y a las diferentes especies de chiles analizadas (Lijun y Xuexiao, 2012 y Oyama *et al.*, 2006).

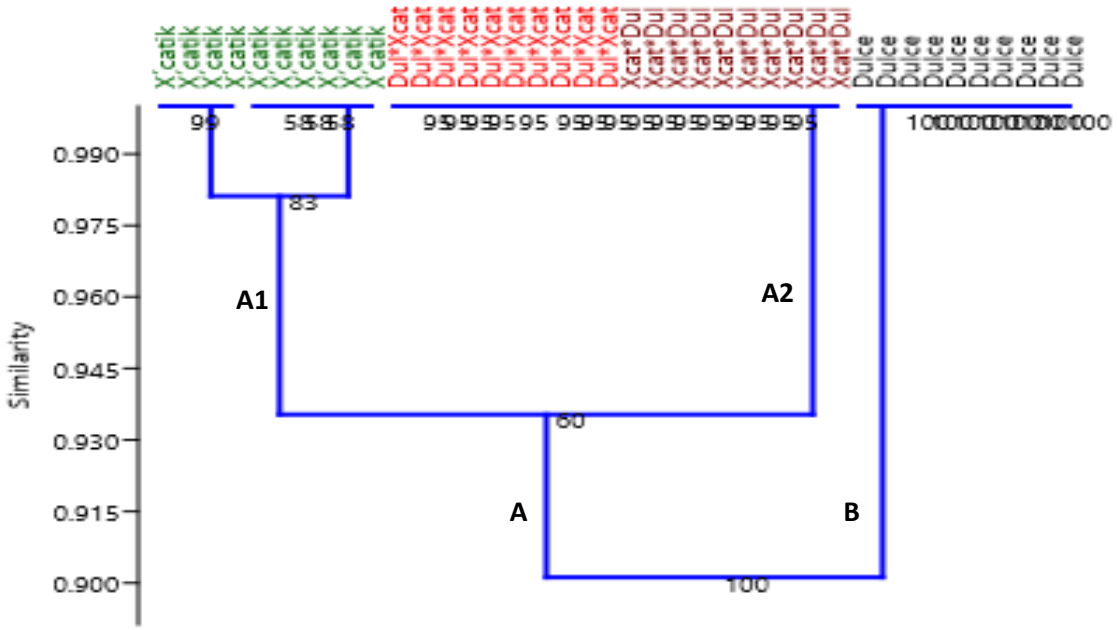

Figura 8. Dendograma UPGMA mostrando las relacione genéticas de los genotipos parentales y híbridos evaluados. Obtenidos con nueve iniciadores ISSR.

El análisis de relaciones genéticas realizado por el método de UPGMA mostró la formación de dos grupos genéticos (A y B) completamente diferenciados (Figura 8). El grupo A se integró de dos subgrupos nombrados A1 y A2. El subgrupo A1 quedo conformado por los individuos del parental chile X´catik, en el subgrupo A2, se encontraron los híbridos (H1 y H2). el grupo 2 quedó integrado por los individuos pertenecientes al parental chile Dulce (Figura 8). La agrupación de los híbridos H1 y H2 con el parental chile X´catik dentro del grupo A, indica que independientemente del tipo de cruza que se realice (cruza directa o reciproca) los híbridos presentan mayor similitud genética con su parental X´catik en comparación con su parental dulce. Este resultado concuerda con lo reportado por Sánchez-

Abarca et al., (2003) quienes lograron diferenciar dos líneas de tomate y su híbrido usando marcadores RAPD. Así mismo, los marcadores ISSR mostraron ser útiles para establecer un plan de manejo para la selección y fitomejoramiento de especies y variedades de *Capsicum* con características deseables, como ha sido demostrado por Bobadilla-Larios *et al.*, (2017). Los planes de fitomejoramiento en plantas con base en la información de los caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares han permitido acelerar el proceso de mejora y selección natural mediante selección artificial orientando a resultados deseables por determinadas características en las plantas (Howell, 1998).

En relación con el análisis de coordenadas principales (ACoP), las dos primeras coordenadas explicaron el 99.24 % de la variación genética total observada. la coordenada principal uno (CoP1) contribuyó con el 94 % de la variación, mientras que la CoP2 aportó 5.24 % de la variación total acumulada (Figura 9). En el plano de coordenadas se observa dos grupos formados por: el chile X´catik, los híbridos (H1 y H2) y el chile dulce respectivamente (Figura 9), en donde el primer grupo (Grupo A) quedo integrado por dos subgrupos (A1 y A2). Los individuos del parental chile X´catik integraron el subgrupo A1, mientras que el subgrupo A2 quedo integrado por los híbridos H1 y H2, el grupo B quedo integrado por los individuos del parental chile dulce. Estos resultados dan soporte con un 100% de similitud a los resultados obtenidos con el UPGMA. Con base a estos resultados se puede asumir que el chile X´cátik es dominante en la hibridación al presentar los híbridos características fenotípicas muy similares a su progenitor. Estos resultados son similares a los reportados por Latournerie *et al.* (2002); Chávez y Castillo (1999) quienes encontraron que los tres primeros componentes explicaron el mayor porcentaje de la variabilidad en diversas especies de *Capsicum*.

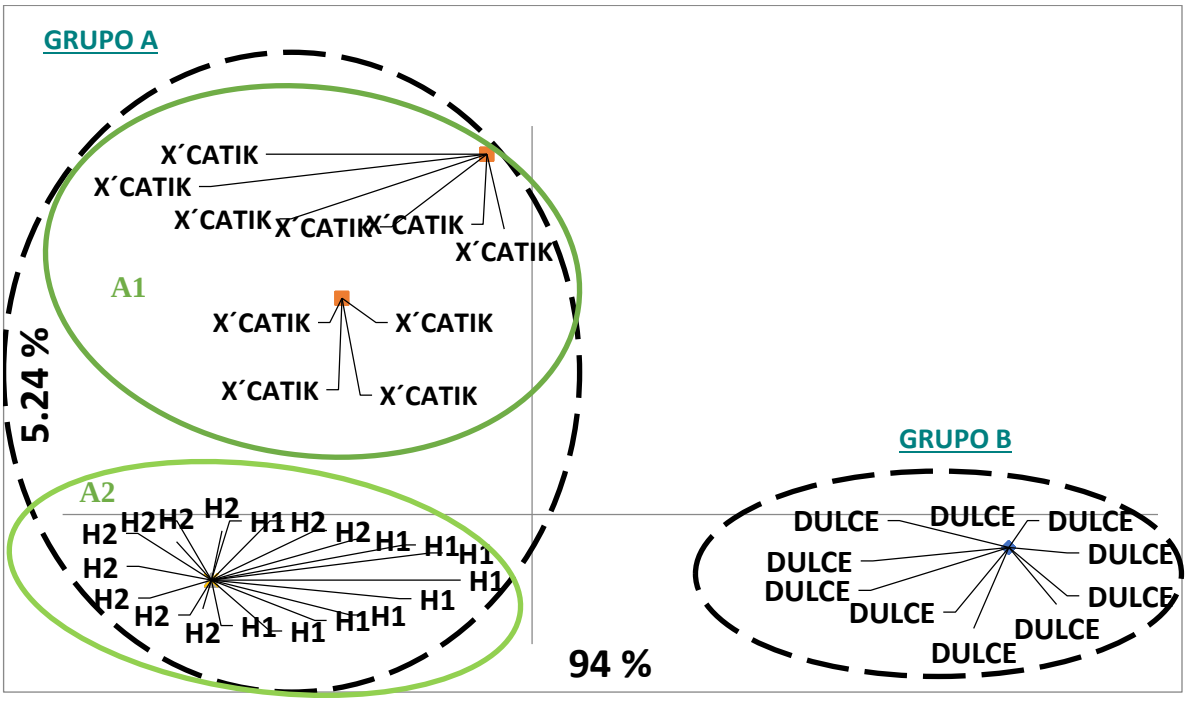

Figura 9. Análisis de coordenadas principales de 4 genotipos de *Capsicum annum.* se muestra un patrón de agrupamiento general basado principalmente en la constitución genética de la especie a la que pertenece cada genotipo.

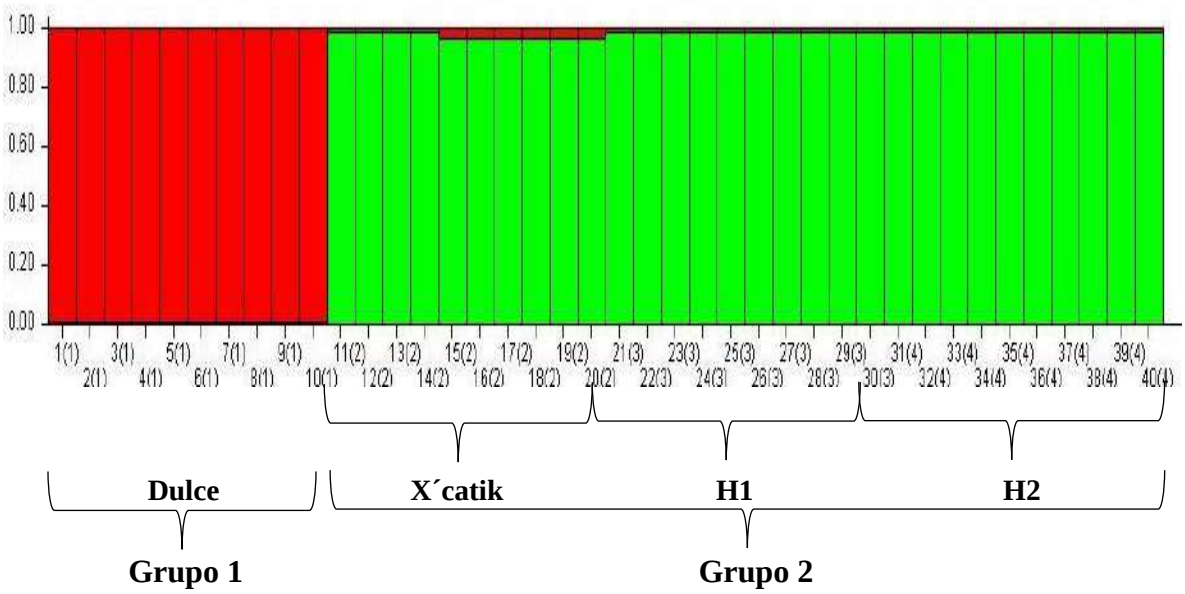

Figura 10. Coeficiente de ancestría estimados por individuos de parentales e híbridos de *capsicum annum* evaluados. Cada individuo está representado por una línea vertical. Los colores representan el porcentaje de ancestría que aporta cada población para generar los híbridos de chile.

El análisis de asignación de individuos (Figura 10) permitió observar dos grupos genéticamente diferenciados, con coeficientes de ancestría cercanos al 100% en cada grupo. El chile dulce formó el primer grupo. El grupo dos quedo integrados por el chile X´catik y los dos híbridos. El análisis de asignación de individuos nos indica que los híbridos H1 y H2 presentan una similitud en el perfil genético cercana al 98% con su parental X´catik, este resultado valida y complementa lo observado con el UPGMA y ACoP. La alta similitud de los híbridos H1 y H2 con el parental X´catik puede deberse a la dominancia del parental sobre los rasgos maternos del chile dulce además, nos indica el grado de dominancia de los parentales en la generación del híbrido (Geleta *et al.* 2004), la facilidad con la que se generaron los híbridos F1 de chile bobo (H1 y H2) da soporte a lo reportado por González *et al*., (2010) y Lopez *et al*., (2019) que mencionan que el chile Bobo es una progenie resultado de un cruce espontáneo entre las variedades locales X´catik y Dulce lo cual valida la existencia de cruces naturales entre especies de *Capsicum* cultivadas en simpatría.

2.5. CONCLUSIÓN

Los híbridos presentaron características morfológicas similares a los parentales en el crecimiento de la planta, morfología de las flores y la forma del fruto. Los análisis moleculares permitieron determinar dos grupos principales un grupo estuvo integrado por los individuos de chile dulce, el segundo grupo se integró por los individuos del chile x´catik y los híbridos H1 y H2. Los resultados indican que los marcadores ISSR son una herramienta útil y confiable para evaluación de la pureza genética de genotipos e híbridos de *capsicum annuum*. los marcadores ISSR permitieron determinar que la pureza genética de los genotipos híbridos F_1 evaluados (H1 y H2) está determinada por la constitución genética de los genotipos parentales bajo evaluación, pero principalmente por el parental x´catik. El chile bobo es un genotipo que mantiene rasgos de su parental x´catik, lo que le confiere alto potencial agronómico que puede ser aprovechado por los productores de chile.

2.6. LITERATURA CITADA

Barrios, O., V. Fuentes., T. Shagarosdky., R. Cristóbal., L. Castiñeiras., Z. Fundora., N. León. 2007. Nuevas combinaciones híbridas de *Capsicum* spp en sistemas de agricultura tradicional de Occidente y Oriente de Cuba. Agrotecnia de Cuba, 31:2. pp 327-335.

Berke, T.G. 2000. Hybrid Seed Production in *Capsicum*. Journal of new sedes, 1: 49- 67.

Días G.B, Gomes V.M, Morales T.M.S, Zottich U.P., Carvalho A.O., MoulinM. Goncalves L.S.A., Rodriguez R, Cunha M. Da. 2013. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. Genetics and Molecular Research 12: 6488-6501

George, R.A.T. 1999. Vegetable Seed Production. CABI Publishing. 327 p.

Geleta, L. F. and Labuschagne, M.T. 2004. Comparative performance and heterosis in single, three-way and double cross pepper hybrids. J Agric Sci 142:659-663.

Garruña, H. R., R. Orellana., A. Larque, S., and A. Canto. 2014. Understanding the physiological responses of a tropical crop (*Capsicum chinense* Jacq.) at high temperature. PLoS ONE, 9(11): e111402.

Latournerie, L. C. S., M. Pérez., G. Castañon., S. Rodríguez., L. Arias. 2001. Valoración in situ de la diversidad morfologica de chiles (*Capsicum annuum* y *Capsicum chinense*).

Pickersgill, B. 1971 relationships between ween and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). Evolution. 25:683691

Rêgo, E. R., M. Rêgo, M., D. Cruz, C., L. Finger, F. and D. Casali, V. W. 2009. A diallel study of yield components and fruit quality in chilli pepper (Capsicum baccatum). Euphytica, 168 (2): 275–287.

SPSS Statistics 2.0. https://www.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg24029274

Smith, P. G. and Heiser C. B. 1951. Taxonomic of *Capsicum sinense* jacq. And the geographic distribution of cultivates *Capsicum* species

Soria, M.; Trejo, J.; Tun, J. y R. Terán. 2002. Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (Capsicum chinense Jacq.). Secretaría de Educación Pública. Subsecretaría

de Educación e Investigación Tecnológicas (SEP-SEIT-ITA). Instituto Agropecuario No. 2, Conkal, Yucatán, México.

Yao H., Zhao Y, Chen D.F Chen J.K, Zhou T.S 2008. ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild population of *Glycyrrhiza uralensis*. Biologia plantarum 52: 117-1 20

González, E.T., C. Casanova, C., P. Gutiérrez, L., T. Torres, L., M. Contreras, F., S. Peraza, S. 2010. Chiles cultivados en Yucatán. In Biodiversidad y Desarrollo.Humano en Yucatán; Durán, R., Méndez, M., Eds.; CICY CONABIO, SEDUMA: Yucatán, Mexico, pp. 342–344.

Latournerie, M. L., J. L. Chávez, S., M. Pérez, P., G. Castañón, N., S. A. Rodríguez, H., L. M. Arias, R., P. Ramírez, V. (2002) Valoración in situ de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Revista Fitotecnia Mexicana 25:25-33.

López Espinosa, T., Latournerie-Moreno L., Castañón-Nájera, G., Ruiz-Sánchez, E., Gómez-Leyva, J. F., Andueza-Noh, R. H. y Mijangos-Cortés, J. O. 2018. Diversidad genética de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) mediante ISSR. Rev. Fitotec. Mex. 41:3. pp 227 – 236

Hernández, V.S. 2011. Los parientes silvestres del chile: Su importancia biológica y cultural. In El chile: Protagonista de la independencia y la revolución; Richterich, K., Ed.; Fundación Herdez: México City, México. pp. 21–26.

Rodriguéz, J., B.V. Peña, O., A. Gil, M., B. Martínez, C., F. Manzano., L. Salazar, L., 2007. Rescate in situ de chile “Poblano” en Puebla, México. Rev. Fit. Mex. 30, pp. 25–32.

Pritchard, J.K., M. Stephens., P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155, pp. 945–959.

Chavez, S. J. L., F. Castillo, G., 1999. Variabilidad en caracteres morfológicos de colectas de chile manzano (Capsicum pubescens R y P). Rev. Fitotecnia Mexicana. 22: pp. 27-41.

Howell, S. H. 1998. Genética de plantas y su desarrollo. Cambridge Univ. Press. M. A. Estados Unidos.

López, L. P. S. y H. F. CASTRO, G. 1999. Al rescate de la diversidad del chile (Capsicum spp) en Oaxaca. Publicación especial. Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. INIFAP, Oaxaca. México. 7 pp.

Raven, P.H., R. F. Vuelque; S. E. Eichhorn. 2005. Biología de plantas. 7ma. ed., Nueva York: W. H. Freeman. Book News, Inc., Portland, OR. pp 359-464.

Sudré, P.C., S. L. Goncalves, A., R. Rodríguez, R., A. T. Do Amaral Junior, A. T., M. Riva Souza E., Dos S. Bento, C. 2010. Genetic variability in domesticated Capsicum spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. Genet. Mol. Res. 9 (1): 283-294

Campos, M. 2009. Efecto de la inoculación de sustratos con Trichoderma spp. sobre el crecimiento y producción de plantas de chile dulce (Capsicum annuum L.), bajo ambiente protegido. Tesis para optar por el título de Ingeniera Agrónoma. San Carlos, Costa Rica: Sede Regional San Carlos, Tecnológico de Costa Rica.

Lijun O. and Z. Xuexiao. 2012. Inter simple sequence repeat análisis of genetic diversity of five cultivated pepper species. African Journal of Biotechnology 11:752-757, https://doi.org/10.5897/AJB10.2551.

Oyama K, S. Hernández Verdugo., C. Sánchez., A. González Rodríguez., P. Sánchez Peña., J. A. Garzón-Tiznado and A. Casas. 2006. Genetic structure of wild and domesticated populations of Capsicum annuum (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. Genetic Resources and Crop Evolution 53:553-562

Terán, S., C. H. Rasmussen., O. May, C. 1998. Las plantas de la milpa entre los mayas. Yucatán, México. pp. 193-20