



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario Tenancingo

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

**CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE 15 COLECTAS DE
CHILE MANZANO (*Capsicum pubescens* R. y P.) DE LA REGION SUR DEL
ESTADO DE MEXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

Imelda Martínez Estrada

COMITÉ DE TUTORES:

Dr. Juan Carlos Reyes Alemán

Dr. Jaime Mejía Carranza

Dr. Luis Miguel Vázquez García

Santa Ana Tenancingo, Estado de México, septiembre de 2016

DEDICATORIA

- A Dios por haberme regalado la vida, por acompañarme a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por permitirme llegar hasta donde hoy estoy.
- A mis padres Ángela Estrada y Ascensión Martínez por apoyarme en todo momento, por lo valores que me inculcaron, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación y por darme un buen ejemplo de vida.
- A mis hermanos Carmen, Arturo, Lupita, Marisol y María de la Luz, por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar.
- A mi esposo, el amor de mi vida José Israel Cerón Castañeda, que ha sido impulso durante mi carrera, apoyo para culminación de la misma, que con su apoyo constante y amor ha sido amigo, compañero, fuente de calma y consejo en todo momento, que con su cariño, comprensión y paciencia he logrado terminar mi carrera.
- A mi hija Salem Estefanía Cerón Martínez por ser un impulso más en mi vida para seguir preparándome profesionalmente.
- A mi próximo hijo que estará entre nosotros en unos meses más y es también impulso en mi vida para seguir adelante.

RESUMEN

Con el objetivo de identificar la variación fenotípica del chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz y Pavón), se realizó un estudio de caracterización morfológica con 15 colecciones cultivadas en la región sur del estado de México. Se evaluaron 86 caracteres morfológicos (68) tomados de la guía de IPGR 1995 y (18) la guía del SNICS 2014. De todos ellos 59 fueron cualitativos y 27 cuantitativos. Se encontró amplia variabilidad cualitativa con polimorfismos en 29 caracteres cualitativos de los 59 evaluados, así como 98 estados diferentes de los 209 (morfoalelos) descritos en las guías. Las colecciones en promedio tienen 4 morfoalelos por atributo. Los polimorfismos cuantitativos estuvieron relacionados principalmente con atributos de la fruto y los cualitativos estuvieron relacionados con caracteres de flor y fruto. El análisis discriminante separó a las colecciones en cuatro grupos, dos de ellos incluyeron sólo la colección, la colecta 12 identificada por el número de flores axilares y color blanco de la corola y la colecta 11 contraste en forma de fruto alargado. Un tercer grupo incluyó las colectas 1, 2, 8, 9 y 13 que comparten el color rojo de fruto. El cuarto grupo incluyó básicamente las colecciones más comerciales. Para el análisis de componentes principales los cuatro primeros componentes principales explicaron 65% de la variabilidad acumulada principalmente explicado por las características de la planta, flor y fruto. La variabilidad cualitativa y cuantitativa que se encuentra en las colecciones de *Capsicum pubescens* evaluados indican que hay suficiente variabilidad para los programas de mejoramiento genético de esta especie.

SUMMARY

With the aim of identifying the phenotypic variation of manzano pepper (*Capsicum pubescens* Ruiz and Pavón), a study of morphological characterization was performed with 15 collections grown in the southern region of the State of Mexico. 86 morphological characters taken from the IPGR 1995 guide (68) and the SNICS 2014 guide (18) were evaluated. From all of them 59 were qualitative and 27 quantitative. It was found wide qualitative variability with polymorphisms in 29 qualitative characters of the 59 evaluated, as well as 98 of the 209 different states (morphoalles) described in the guides. The collections on average have 4 morphoalles by attribute. Quantitative polymorphisms were related mainly with attributes of the fruit and the respective qualitative were related to flower and fruit characters. The discriminant analysis separated to collections in four groups. Two of them included just a single collection, the number 12 identified by the number of axillary flowers and white color of the corolla and the number 11 contrasted in shape and fruit length. A third group included the collections 1, 2, 8, 9 and 13 which share the red color of the fruit. The four group included basically the most marketable collections. For the principal components analysis the first four principal components explained 65% of the accumulated variability mainly explained by characteristics of plant, flower and fruit. The qualitative and quantitative variability found in the collections of *Capsicum pubescens* evaluated show that there is enough variability for a genetic breeding programs of in this species.

AGRADECIMIENTOS

- Al Centro Universitario UAEM Tenancingo, por darme la oportunidad de estudiar y realizar mi investigación en sus instalaciones.
- A mis tutores Dr. Juan Carlos Reyes Alemán, Dr. Jaime Mejía Carranza, y Dr. Luis miguel Vázquez García, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de investigación bajo su cargo y por el aporte de conocimientos para la culminación de la misma.
- Al CONACYT por la beca otorgada durante los dos años de maestría.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | i |
| RESUMEN | ii |
| SUMMARY | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| ÍNDICE GENERAL | v |
| ÍNDICE DE CUADROS | 1 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 3 |
| I. INTRODUCCIÓN | 5 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 7 |
| 2.1 Capsicum spp. | 7 |
| 2.2 Capsicum pubescens R. y P. | 8 |
| 2.2.1 Origen, distribución | 9 |
| 2.2.2 Clasificación taxonómica | 9 |
| 2.2.3 Descripción botánica | 10 |
| 2.2.4 Propiedades organolépticas | 11 |
| 2.2.5 Variedades del cultivo | 11 |
| 2.2.6 Requerimientos del cultivo | 11 |
| 2.2.7 Plagas y enfermedades | 12 |
| 2.2.8 Importancia del cultivo, producción y comercialización | 13 |
| 2.3 Caracterización morfológica y molecular | 14 |
| 2.3.1 Caracterización morfológica | 14 |
| 2.3.2 Caracterización molecular | 17 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| IV. HIPÓTESIS | 28 |
| V. OBJETIVOS | 28 |
| 5.1 Objetivo general | 28 |
| 5.2 Objetivos específicos | 28 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 6.1 Ubicación del experimento | 29 |
| 6.2 Material biológico | 29 |
| 6.3 Siembra y trasplante de las colectas | 31 |

| | |
|--|-----|
| 6.5 Manejo agronómico..... | 31 |
| 6.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA..... | 32 |
| 6.6.1 Plántula..... | 32 |
| 6.6.2 Planta..... | 33 |
| 6.6.3 Flor..... | 33 |
| 6.6.4 Fruto y semilla..... | 34 |
| 6.7 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR..... | 36 |
| 6.7.2 Colecta del material vegetal..... | 36 |
| 6.7.3 Extracción de ADN con Kit comercial Analytikjena de Biometra..... | 37 |
| 6.7.3 Evaluación de ADN con electroforesis..... | 38 |
| 6.7.4 Marcadores moleculares microsátélites..... | 40 |
| 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 42 |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 43 |
| 7.1 CARACTERIZACION MORFOLÓGICA..... | 43 |
| 7.1.2 Resultados comparación de medias, análisis de varianza y moda..... | 43 |
| 7.1.3 Resultados taxonomía numérica..... | 56 |
| 7.1.4. Resultado análisis multivariado..... | 59 |
| 7.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR..... | 65 |
| 7.2.3 Evaluación de la cantidad y calidad de ADN..... | 65 |
| 7.3 ARTÍCULO..... | 68 |
| VIII. DISCUSIÓN GENERAL..... | 84 |
| IX. CONCLUSION GENERAL..... | 85 |
| X. REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS..... | 86 |
| XI. ANEXOS..... | 94 |
| 11.1 Anexo 1. Figuras para la caracterización de <i>Capsicum pubescens</i> , de acuerdo a los descriptores de IPGRI, 1995..... | 94 |
| 11.2 Anexo 2. Figuras para la caracterización de la guía técnica para la descripción varietal de <i>Capsicum annuum</i> L. del SNICS 2014..... | 97 |
| 11.3 Anexo 3. Descriptores utilizados de la Guía del SNICS (2014)..... | 98 |
| 11.4 Anexo 4. Descriptores utilizados de la guía del IPGRI (1995)..... | 99 |
| 11.5 Anexo 5. Cuadros de resultados de taxonomía numérica..... | 104 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Colectas caracterizadas en el Centro Universitario UAEM Tenancingo..... | 30 |
| Cuadro 2. Localización y descripción de las colectas 8 colectas muestreadas en el Mercado Riva Palacio, Tenancingo Estado de México..... | 31 |
| Cuadro 3. Cantidad de fertilizante utilizado para preparar 10000 litros de solución nutritiva para plantas de chile manzano establecidas en bolsa e invernadero, determinadas según Stainer (1984)..... | 32 |
| Cuadro 4. Secuencias de 6 primers para <i>Capsicum</i> tomados de Sanwen <i>et. al.</i> , 2001..... | 40 |
| Cuadro 5. Secuencias de 13 primers para <i>Capsicum</i> tomados de Umesh Reddy ² , 2004..... | 41 |
| Cuadro 6. Comparación de medias en largo y ancho de hoja cotiledónea en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 43 |
| Cuadro 7. Moda en cuatro caracteres cualitativos en plántula observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 44 |
| Cuadro 8. Comparación de medias en ocho caracteres cuantitativos observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 46 |
| Cuadro 9. Moda en 16 caracteres cualitativos en planta observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 48 |
| Cuadro 10. Comparación de medias en cuatro caracteres cuantitativos de flor observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 49 |
| Cuadro 11. Moda en 12 caracteres cualitativos de flor observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 51 |
| Cuadro 12. Comparación de medias en nueve caracteres cuantitativos de fruto observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 52 |
| Cuadro 13. Moda en 25 caracteres cualitativos de fruto observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 54 |
| Cuadro 14. Comparación de medias en cuatro caracteres cuantitativos de semilla observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 55 |
| Cuadro 15. Moda en dos caracteres cualitativos de semilla observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 56 |
| Cuadro 16. Taxonomía numérica para caracteres de plántula, planta, flor y fruto en 15 colectas de chile manzano..... | 57 |
| Cuadro 17. Descriptores que presentan polimorfismo en las colectas de chile manzano..... | 57 |

| | |
|--|------------|
| Cuadro 18. Estados únicos encontrados en 15 colectas de chile manzano..... | 58 |
| Cuadro 19. Matriz de distancias euclídea promedio de 15 colectas de chile manzano..... | 61 |
| Cuadro 20. Análisis de componentes principales (ACP) para 27 variables cuantitativas de las colectas de chile manzano..... | 62 |
| Cuadro 21. Contribución de las variables cuantitativas en los cuatro primeros componentes principales (CP) de las 15 colectas de chile manzano..... | 63 |
| Cuadro 22. Matriz de coeficientes de correlación entre nueve variables cuantitativas pertenecientes al CP1 de 15 colectas de chile manzano..... | 64 |
| Cuadro 23. Matriz de coeficientes de correlación entre nueve variables cuantitativas pertenecientes al CP2 de 15 colectas de chile manzano..... | 65 |
| Cuadro 24. Matriz de coeficientes de correlación entre cinco variables cuantitativas pertenecientes al CP3 de 15 colectas de chile manzano..... | 65 |
| Cuadro 25. Matriz de coeficientes de correlación entre cinco variables cuantitativas pertenecientes al CP4 de 15 colectas de chile manzano..... | 66 |
| Cuadro 26. Resultados de la evaluación de calidad y cantidad de ADN en 15 colectas de chile manzano..... | 66 |
| Cuadro 27. Descriptores utilizados de la guía SNICS..... | 98 |
| Cuadro 28. Descriptores utilizados de la guía IPGRI..... | 99 |
| Cuadro 29. Descriptores, estados del descriptor y estados únicos encontrados en 59 caracteres cualitativos de chile manzano..... | 104 |
| Cuadro 30. Clasificación de 59 caracteres cualitativos y 27 cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de 15 colectas de chile manzano..... | 106 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Centro Universitario UAEM Tenancingo, Estado de México..... | 29 |
| Figura 2. Colectas muestreadas en el mercado Riva Palacio, Tenancingo Estado de México..... | 30 |
| Figura 3. Medición de caracteres en fruto de 15 colectas de chile manzano..... | 35 |
| Figura 4. Colecta de muestras y molienda con nitrógeno líquido de 15 colectas de chile manzano..... | 36 |
| Figura 5. Kit comercial Analytikjena de Biometra..... | 37 |
| Figura 6. Gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE..... | 38 |
| Figura 7. Carga de muestras de ADN en gel de agarosa y corrimiento del ADN en la cámara para electroforesis y regulador de voltaje..... | 39 |
| Figura 8. Visualización del ADN con fotodocumentador de geles..... | 40 |
| Figura 9. Color de hipocótilo 1) color verde colecta 12 y 2) color morado colecta tres..... | 44 |
| Figura 10. Tabla de color con las que se tomó el color de hoja..... | 47 |
| Figura 11. Color corola..... | 50 |
| Figura 12. Estigma excerto de la flor de chile huacle (<i>Capsicum annumm</i> L.), foto del artículo (López y Pérez 2015)..... | 50 |
| Figura 13. Medición de color en fruto utilizando tablas de colores..... | 53 |
| Figura 14. Profundidad de la cavidad peduncular, A) poco profunda, B) mediana y C) profunda..... | 54 |
| Figura 15. Color de semilla. A) Café claro, B) Café y C) Café oscuro..... | 56 |
| Figura 16. Densidad de Macollamiento, A) Macollamiento escaso colecta 15 y B) Macollamiento denso colecta ocho..... | 58 |
| Figura 17. Análisis discriminante en 15 colectas de chile manzano. Verde= colectas contrastantes, Naranja= colectas comerciales y Rojo= colectas con fruto rojo..... | 59 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 18. Dendograma, formación de cinco conglomerados con distancia euclídea promedio de 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México..... | 60 |
| Figura 19. Primeros dos componentes principales con datos estandarizados de 27 caracteres cuantitativos en 15 colectas de chile manzano..... | 62 |
| Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con las muestras del ADN extraído en 15 colectas de chile manzano, observado en fotodocumentador de geles..... | 67 |
| Figura 21. Forma de la hoja cotiledónea..... | 94 |
| Figura 22. Pubescencia del tallo..... | 94 |
| Figura 23. Hábito de crecimiento..... | 94 |
| Figura 24. Forma de la hoja..... | 95 |
| Figura 25. Pubescencia de la hoja..... | 95 |
| Figura 26. Posición de la flor..... | 95 |
| Figura 27. Margen del cáliz..... | 95 |
| Figura 28. Constricción anular del cáliz..... | 96 |
| Figura 29. Forma del fruto en unión con el pedicelo..... | 96 |
| Figura 30. Cuello en la base del fruto..... | 96 |
| Figura 31. Forma del ápice del fruto..... | 96 |
| Figura 32. Ápice del fruto, vestigio de la floración..... | 97 |
| Figura 33. Arrugamiento transversal del fruto..... | 97 |
| Figura 34. Forma del fruto..... | 97 |

I. INTRODUCCIÓN

El centro de origen de *Capsicum* spp., es América del Sur y América central. Su número de especies va de 20 a 30 según distintos autores (Loaiza, et al., 1989; Eshbaugh, 1983; Hernández, et al., 1999; Morán, et al. 2004; Milla, 2006) y de las cuales solo cuatro o cinco son domesticados y cultivados en el mundo para fines principalmente alimenticios. El chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es una especie originaria de Sudamérica y se cultiva en diversos países. El fruto de *Capsicum* sp. es un producto que además de dar sabor a la comida, tiene cualidades nutritivas (contenido de vitamina A y C) (Dürüst y Dürüst, 1997), (Fawell, 1998) y (Maroto, 2002).

Es una de las especies domesticadas más antiguas que se conocen, fue introducido al país a principios del siglo XX (Arqueología mexicana, 2009), sin embargo, en comunicación oral con productores de la región mencionan que fue introducido antes ya que no es un cultivo que se considere nuevo además de que ya se tiene un amplio conocimiento sobre esta especie. Esto puede explicar la amplia variabilidad que se encuentra hoy en día de esta especie debido a la selección antrópica que realizan los productores de los genotipos utilizados en la región (Latournerie, 2010), los cuales que aún no están caracterizados, condición que facilitaría la selección de materiales promisorios a utilizar en mejoramiento genético y conservación .

Generalmente se cultiva en huertos familiares, en regiones con altitudes que van de los 1700 a los 2400 msnm, en México, se le encuentra en algunos lugares altos, templados y fríos de Michoacán, Querétaro, Estado de México, Puebla y Chiapas (Pérez y Castro, 1998). Se encuentra cultivado a cielo abierto, traspatio e invernadero, es utilizado como condimento insustituible en la dieta de los habitantes de del sur del Estado de México.

La caracterización de materiales permite el registro de valores de descriptores agronómicos, morfológicos y fisiológicos altamente heredables y expresados en diferentes ambientes (IPGRI, 1980) y que en conjunto con información relacionada con prácticas culturales permiten identificar la variabilidad y grupos genéticos, factores elementales para el mejoramiento genético y desarrollo de materiales uniformes con mayores ventajas en comercialización.

Además se requiere de una caracterización molecular a partir de marcadores para identificar la diversidad genética dentro de cada especie originada por la deriva genética y las mutaciones, las cuales se han definido como cambios espontáneos en una o varias características morfológicas o fisiológicas de una especie (De la Loma, 1970). Es por ello que el objetivo de la investigación fue describir la diversidad morfológica de 15 colectas de chile manzano, cultivadas en la región sur del Estado de México como una primera estrategia para la identificación de variabilidad genética de esta especie.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Capsicum* spp.

El chile (*Capsicum* spp), es considerado una de las primeras plantas cultivadas de Mesoamérica y la continuidad de su uso se confirma desde 7000 y 5000 años A.C. Es utilizado principalmente como condimento, medicinal y para defensa personal en gas pimienta; además de un sinnúmero de usos que le daban nuestros antepasados como castigo, atributo y moneda. (Long-Solis, 1986). Es uno de los cultivos más importantes en México y el mundo, actualmente se reconocen 5 especies cultivadas: *C. baccatum* *C. pubescens*, *C. frutescens*. *C. chinense* y *C. annuum* (IPGRI, 1983).

***Capsicum annuum* ssp.**

Son plantas herbáceas o arbustivas de 1.5 m de alto en promedio, pueden ser perennes o anuales, principalmente glabras: con flores solitarias, raramente en pares, ocasionalmente fasciculadas, sin constricción en la base del cáliz y pedicelo, a veces un poco rugoso; cáliz dentado, ausente o rudimentario; corola de color blanco a azul, raramente violeta, sin manchas difusas en la base de los pétalos; pétalos usualmente rectos; anteras normalmente de color azul a violeta, filamentos cortos, frutos de color verde en estado inmaduro y cuando están maduros son de color naranja, rojos y púrpura-amarillo, son persistentes, pendientes, raramente erectos, variables en su tamaño y forma; semillas de color crema a amarillo (D'Arcy y Eshbaugh, 1974).

Capsicum chinense

Arbustos pequeños de 1.5 m de alto en promedio, glabros a pubescentes; con dos o más flores por nudo, algunas solitarias, pendientes, raramente erectas; cáliz del fruto maduro carece de dientes y presenta una marcada constricción anular en su base; corola blanca-verdosa o verde-amarillenta algunas blancas lechosas o púrpuras; sin manchas difusas en la base de los pétalos; pétalos de la corola rectos; anteras de color violeta a azul, amarillas (Smith y Heiser, 1957); frutos pendientes,

persistentes, de pulpa firme, de colores café rojo, melocotón, amarillo naranja, amarillo limón, o crema, de varias formas; semillas de color crema a amarillo (D'Arcy y Eshbaugh, 1974).

Capsicum frutescens

Son hierbas o arbustos pequeños, de hasta 2 m de alto, glabros a pubescentes, en su mayor parte finamente pubescentes; con dos o más flores por nudo, raramente una, erectas; no tiene constricción en la base del cáliz y el pedicelo; cáliz dentado o ausente; corola blanco verdosa; anteras azul a violeta raramente amarillas; fruto inmaduro verde, frutos maduros naranjas, rojos, pigmentación oscura, pendientes y deciduos, con pulpa frecuentemente blanda; semillas de color crema a amarillo (D'Arcy y Eshbaugh, 1974).

Capsicum baccatum

Hierbas o pequeños arbustos extendidos de 1-1.5 m de alto, principalmente glabros, algunas veces pubescentes; una flor por nudo, raramente dos o más; pedicelos erectos o pendientes en la antesis; cáliz ciatiforme con distintos dientes 36 de 0.5-1.5 mm de largo; corola rotada, radio de 7.4-12 mm, de color crema a blanco o blanco-verdosa, con manchas amarillas a verdes difusas en la base de cada lóbulo; anteras amarillas, filamentos muy largos de 2.6-4.2 mm: frutos de color café, rojo, naranja, o amarillo limón, pendientes, muy raramente erectos, persistentes, de pulpa firme, de varias formas, normalmente alargados, muy raramente globosos; semillas de color crema a amarillo, paja (D'Arcy y Eshbaugh, 1974).

2.2 *Capsicum pubescens* R. y P.

Es conocido como chile manzano en el Estado de México, “pubescens” significa peludo, que se refiere a las hojas pubescentes de la planta. La vellosidad de las hojas junto con las semillas negras o de color oscuro, distinguen a esta especie de otras. Se adapta en lugares que van de templados a fríos, produce frutos carnosos, picantes y aromáticos que se consumen en fresco. Se venden en mercados de las

partes altas y frías donde tienen una buena aceptación y demanda. Se consume en fresco ya que es muy carnoso y se dificulta deshidratarlo (Laborde y Pozo, 1982). Su demanda va en aumento debido a la diversificación en las formas en que se consume, su precio puede llegar a ser aproximadamente de un 100 hasta un 200% mayor al chile serrano (*C. annum*), por lo cual es un cultivo atractivo para los productores (Pérez y Castro, 1998). En la zona sur del estado de México se cuenta con gran variabilidad en esta especie, ya que cuenta con las condiciones de clima favorables para el cultivo además de que paso de ser un cultivo de traspatio y asociado con árboles frutales a un monocultivo intensivo en invernadero.

2.2.1 Origen, distribución

Es originario de las partes altas de Perú, Bolivia y Ecuador (Pozo, 1983). Actualmente se encuentra distribuido en las zonas altas desde Argentina hasta el centro de México. *C. pubescens* la única de las especies domesticadas de éste género que no tiene formas silvestres (Heiser y Pickersgill, 1969).

En México se le puede encontrar en las partes altas de Puebla, Michoacán, Estado de México y Querétaro.

2.2.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo con Heiser y Pickersgill (1969) su número cromosómico es $2n = 24$, la clasificación taxonómica del chile manzano es la siguiente:

REINO..... Vegetal
SUBREINO.....Embriophytas
DIVISIÓN.....Tracheophytas
SUBDIVISIÓN.....Pteropsidas
CLASE.....Angiospermas
SUBCLASE.....Dicotiledóneas
ORDEN.....Tubiflorales
FAMILIA.....Solanaceae
GENERO.....*Capsicum*
EPÍTETO ESPECÍFICO.....*pubescens Ruiz y Pavón*

2.2.3 Descripción botánica

De acuerdo a Pérez y Castro (2010):

Raíz: Consta de una raíz principal típica o pivotante de origen seminal y numerosas raíces secundarias que pueden alcanzar hasta 1.2 m de profundidad y 0.8 m de exploración horizontal; 80% de ellas se encuentran en una capa de 20 a 30 cm, pero cuando se cultiva en sustratos inertes se concentra en 15 cm, es más ramificada y su volumen es reducido.

Tallo: es leñoso con hábito de crecimiento compacto y erecto; presenta abundante pubescencia y es de color verde, excepto en los primeros entrenudos, en los cuales es púrpura. Su ramificación es pseudodicotómica.

Hoja: es simple, su forma es cordada con ápice acuminado y borde liso, excesivamente vellosa en el haz y la nervadura es reticulada perinerve, peciolada y su filotaxia es alterna dística.

Flor: Hermafrodita, de color violeta y raramente blanca, el centro es blanco, el cáliz y la corola están fusionados en su base. Los estambres tienen la misma longitud y el ovario es súpero. En las axilas de las hojas se encuentran uno o dos peciolos cuya proporción puede ser erecta o intermedia.

Fruto: En estado inmaduro es verde y maduro, puede ser amarillo, naranja o rojo, tiene una placentación axilar, su forma varía dependiendo el número de lóculos; cuando se presenta uno o dos tiene la forma de pera y cuando tiene tres o cuatro la forma es de manzana, la longitud del fruto es de 4 a 8 cm y diámetro de 2 a 6 cm; el grosor del pericarpio varía de 2 a 6 mm. La forma del fruto en la unión con el pedúnculo es truncada y acorazonada, no presenta cuello en la base del fruto y la forma del ápice es hundido y raras veces de forma obtusa, presenta una ligera corrugación en corte transversal.

Semilla: Es la única que posee semillas de color negro. Éstas, son de forma ovalada, con el borde ligeramente ondulado. Mide alrededor de 5 mm de diámetro y están constituidas de testa gruesa, embrión y endospermo.

Habito de crecimiento: Uno es de porte bajo y otro es de porte alto, diferenciados básicamente por la longitud de entrenudos y la maduración de los frutos. Estas plantas se encuentran mezcladas en las diferentes poblaciones de chile manzano que existen en las regiones altas y frías del país, las cuales es necesario caracterizar y formar variedades de uno u otro hábito de crecimiento (Pérez., 2002).

2.2.4 Propiedades organolépticas

El color de fruto del chile manzano, puede ser amarillo, naranja o rojo todos de sabor picante y tamaño que va desde pequeño a grande con altos contenidos de capsaicinoides de los cuales el 80% es cubierto por capsaicina y dihidrocapsaicina (Topuz y Ozdemir, 2004). También presenta altos niveles de vitaminas como la C, los cuales pueden variar de acuerdo a la variedad o colecta, así como también a madurez del fruto, manejo agronómico de la planta y factores climáticos (Mozafar, 1994).

2.2.5 Variedades del cultivo

La Universidad Autónoma de Chapingo, en Texcoco, Estado de México ha desarrollado variedades tres variedades la Amarillo Chapingo, Puebla y Zongólica por Puebla (Pérez, 2002).

2.2.6 Requerimientos del cultivo

Temperatura: Temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo adecuado de ésta especie es de 18 a 22°C en el día y 10 a 12°C en la noche (Perez y Castro, 2010), (Mosso, 1994), se adapta a lugares fríos, tolera heladas ligeras y puede fructificar en temperaturas bajas de 5 a 15°C (Pozo, 1983). A temperaturas mayores

a los 35°C provocan aborto de flores. La especie se adapta bien en altitudes de 1700 a 2500 m, siempre que no existan heladas. La temperatura para la germinación, que generalmente ocurre a los 8 días, es de 25 a 28°C (Perez y Castro, 2010), a temperaturas de 5 a 12°C la germinación de la semilla es lenta (Mosso, 1994).

Humedad relativa y del suelo: Se desarrolla bien con humedad relativa de 70 a 80%. Arriba de este valor se tiene poca dehiscencia de anteras disminuyendo la polinización y fecundación de los óvulos, y en consecuencia se tiene menor número de semillas y a su vez menor tamaño de fruto. Con humedades relativas menores al 40% existe deshidratación de los granos de polen. Lo cual también ocasiona una baja polinización y formación de semillas. La humedad óptima del suelo o sustratos de cultivo es de 70 a 80 % de la humedad aprovechable (Perez y Castro, 2010).

Sustrato: Puede crecer y desarrollarse en suelo desde andosoles, los cuales poseen contenidos altos de materia orgánica y pH ácido, también lo puede hacer en luvisoles, cambisoles, regosoles y acrisoles. Sin embargo, lo óptimo para mejorar el proceso de absorción de la raíz y proveer un desarrollo y crecimiento adecuado, se requiere que el suelo tenga una textura de franca a arenosa, estructura granular, profundos y con pH de 5.5 a 6.5 (Perez y Castro, 2010).

2.2.7 Plagas y enfermedades

Las plagas que atacan al chile manzano son: mosquita blanca (*Trialeuodes vaporarium* Westwood y *Bemisia* pp) como principales especies, araña roja (*Tetranychus* sp), araña blanca (*Polyphagotarsonemus latus* Banks), caracol del jardín (*Helix pomatia* L.), gusano del fruto (*Heliothis virescens* Fabricius) y pulgón (*Myzus persicae* Sulzer). (Pérez y Castro, 2010)

Enfermedades que atacan al cultivo son: Marchitez del chile manzano causados por *Phytophthora capsici* Leonian (Pérez y Castro, 2010) y *Fusarium oxysporum* Schlecht (Vallejo, 2010), Botrytis (*Botrytis cinérea* Pers), Fumagina (*fumagina* spp.) y *Pseudomonas* spp. (Pérez y Castro, 2010)

2.2.8 Importancia del cultivo, producción y comercialización

El subsector hortícola de México aporta 16% del valor de la producción agrícola con sólo el 2.7% de la superficie agrícola y 2.1% de la producción total (SAGARPA, 2010). Por otro lado, las hortalizas mexicanas son de las pocas actividades que mantienen una balanza comercial positiva dentro del sector rural, ya que el volumen exportado fue 4.1 veces mayor que el importado desde 1961 a 2010 (FAO-FAOSTAT, 2012). La producción de hortalizas en México ha tenido un aumento en las últimas dos décadas, uno de ellas es el cultivo del chile (*Capsicum spp.*) alimento fundamental en la dieta diaria de los mexicanos. De la diversidad de chiles que se cultivan en el territorio nacional, el chile manzano es uno de los más importantes y ha cobrado mayor importancia en los últimos 15 años (Pérez y Castro, 2008).

Debido a la demanda del chile manzano, ha incrementado la producción en huertos semicomerciales y actualmente de este producto ha motivado el desarrollo de sistemas de producción que elevan la productividad y su calidad postcosecha (Espinosa, 2005). Según Pérez y Castro (2008) y, Espinosa y Villa (2008), las principales zonas donde se produce chile manzano, son: Sierra Norte de Puebla (Tlathuiquitepec, Zacapoaxtla y Teziutlán); Tacámbaro y Zitácuaro, Michoacán, Centro de Veracruz (Huatusco, Coscomatepec y Zongolica), Coatepec de Harinas, Villa Guerrero y San Miguel Tlaixpan, Edo. México; y San Cristóbal y Motozintla, en el Estado de Chiapas.

Sistemas de producción actuales; campo abierto asociado con árboles de pino y frutales e intensivo bajo condiciones de invernadero. El de campo abierto se caracteriza por tener problemas fitosanitarios como la secadera del chile (*Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*), con poco rendimiento (15 a 20 ton·ha⁻¹·año), frutos de mala calidad (tamaño pequeño, deformes), con enfermedades fungosas, picadura de aves y corta vida postcosecha, entre otros. La producción de chile manzano en invernadero, inició hace 12 años y tiene ventajas como mayor control de temperatura, humedad relativa, radiación, nutrición de las plantas,

empleo de altas densidades de población (12,000 plantas por hectárea), alta calidad de fruto y rendimientos elevados (70 a 80 t-1-ha-1-año), y menor daños causados por plagas y enfermedades (Pérez y Castro, 2008).

De acuerdo a encuestas realizadas y productores visitados en el Estado de México, los mercados con mayor distribución del chile manzano son la Central de abastos de Ecatepec y la Central de abastos de la ciudad de Toluca (Espinosa, 2010). En menor escala se encuentran los mercados locales de Texcoco, Coatepec Harinas, Tenancingo, Valle de Bravo y Villa Guerrero los cuales distribuyen a los consumidores finales. Existen empresas importantes para la exportación de chile manzano, dos están ubicadas en Coatepec Harinas, Estado de México y una en el estado de Chihuahua.

Los centros de distribución de frutos de chile manzano como la central de abastos de Ecatepec y Toluca presentan características similares, ya que venden frutos provenientes de campo abierto e invernadero (Espinosa, 2010). En el caso de chile manzano en México, los estándares de calidad en los mercados no ha estado debidamente reglamentado y solo se ha basado en lineamientos de orden regional, establecidos por los principales compradores en los centros de consumo y distribución del país.

2.3 Caracterización morfológica y molecular

2.3.1 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de recursos fitogenéticos es una actividad que permite la selección de los materiales más promisorios para su posterior utilización en programas de mejoramiento, (IPGRI, 1980), la caracterización consiste en registrar aquellas características que son altamente heredables, que pueden verse fácilmente y que pueden ser expresadas en todos los ambientes. Las características

morfológicas se han utilizado para estudios de variabilidad genética, identificación de plantas y conservación de los recursos genéticos.

Las descripciones morfológicas, agronómicas, fisiológicas de una caracterización deben ser acompañadas de información relacionada con prácticas culturales, condiciones ambientales además, deben crecer bajo condiciones uniformes para asegurar de esta manera que las diferencias registradas sean típicas de los materiales bajo esas circunstancias (Engels, 1979). La caracterización es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos para programas de conservación.

2.3.2 Definición y tipos de descriptores

Descriptor: característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión, son aplicados en la caracterización y evaluación de las accesiones (Franco e Hidalgo, 2003).

Diferentes tipos de descriptores de acuerdo con Franco e Hidalgo, (2003):

- **De pasaporte:** Proporcionan información básica que se utiliza para el manejo general de la accesión, incluyendo el registro en el banco de germoplasma y cualquier otra información de identificación, describen los parámetros que se deben observar cuando se hace la recolección original.
- **De manejo:** Proporcionan bases para el manejo de las accesiones en el banco de germoplasma y ayudan durante su multiplicación y regeneración, como las fechas de multiplicación, cantidades de semillas disponibles, porcentajes de viabilidad.
- **Del sitio y el medio ambiente:** Describen parámetros específicos del sitio y del ambiente, ayudan en la interpretación de resultados cuando se realizan

pruebas de caracterización y evaluación, también se incluyen, coordenadas geográficas, características de clima y suelos.

- **De caracterización:** Permiten la discriminación relativamente fácil entre fenotipos. Son caracteres altamente heredables que pueden ser fácilmente detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además, pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales considerados como deseables como colores y formas de tallos, hojas, flores, semillas y frutos. En los últimos años se están incluyendo descriptores relacionados con los marcadores moleculares.
- **De evaluación:** La expresión de la mayoría de los descriptores de esta categoría depende del medio ambiente y, en consecuencia, se requieren métodos experimentales especiales para su evaluación. En este tipo de descriptores se incluyen caracteres como rendimiento, productividad agronómica, susceptibilidad a estrés y caracteres bioquímicos y citológicos, los cuales generalmente son de mayor interés en el mejoramiento de cultivos.

Estados del descriptor y tipos de datos

Se esperaría que las características visibles de una especie fueran homogéneas, sin embargo, todas no se expresan con la misma intensidad y algunos miembros de la población pueden presentar diferentes grados de expresión que se traducen en diferentes tipos de datos o categorías de variables. Los descriptores se pueden diferenciar de acuerdo con el estado que presentan, lo cual es conocido como 'estados del descriptor' se registran mediante escalas de valor (Franco e Hidalgo, 2003).

Existen distintas categorías de datos, según la expresión del descriptor que puede ser en forma cualitativa o cuantitativa. En forma cualitativa, se pueden generar datos binarios (también llamados de doble estado), datos con secuencia (ordinales o

multiestado lógico) y datos sin secuencia (nominales, multiestado no lógico). En forma cuantitativa, los datos generados pueden ser discontinuos (llamados también discretos) y continuos (Franco e Hidalgo, 2003).

2.3.2 Caracterización molecular

2.3.2.1 Marcadores moleculares

El estudio del ADN permite señalar aquellas características que resultan útiles para ciertas especies como la resistencia a ciertos patógenos y plagas, alta productividad, color, que son de interés de interés agronómico entre otras. Presentan muchas ventajas en comparación con los de tipo morfológico, por su independencia de efectos del medio ambiente, permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo y la caracterización de germoplasma. Los trabajos con marcadores moleculares parten de la información genética de cada individuo contenido en el núcleo de la célula (Wilches, 2014).

Un marcador molecular es un fragmento o secuencia de ADN correspondiente a una característica, es una valiosa herramienta como complemento de los métodos morfométricos y pueden utilizarse para otros propósitos como: la determinación de la distinguibilidad, uniformidad, estabilidad de las nuevas variedades, y mejoramiento de especies (Escandón et. al, 2005). Algunas de las técnicas más utilizadas son aloenzimas e izoenzimas, RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic ADN), Polimorfismo de nucleótido simple (SNPs), microsatélites (SSR) y Secuenciación de ADN. Las ventajas de los marcadores moleculares microsatélites (SSR) es, que son altamente variables, abundantes en los eucariotes y generalmente bien distribuidos a través del genoma, son ampliamente variables y codominantes, de ahí que su información es alta comparada con otros marcadores tales como FRLPs, AFLPs y RAPDs (Schlotterer y Tausz, 1992).

2.3.2.1.1 Tipos de marcadores moleculares

Las técnicas más conocidas son: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) y AFLP (Amplified fragment-length polymorphism) y la más reciente es la conocida como microsatélites (SSR-Simple Sequence Repeats).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Es usada desde los años 70, son los primeros marcadores utilizados en polimorfismos en la secuencia de ADN (Parker et al., 1998), permite distinguir organismos entre sí entre sí, mediante el análisis de los patrones que se derivan al romper el ADN en pequeños fragmentos. Si dos organismos son diferentes, en la distancia que exista entre dos sitios de ruptura particular. La similitud de los patrones generada puede ser usada entonces para diferenciar especies e inclusive razas entre sí.

Este método expresa diferencias específicas del ADN que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares llamadas endonucleasas cada una de ellas de origen bacteriano, reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente cualquier ADN que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000). Presentan polimorfismo bajo-alto, estabilidad ambiental alta, número de loci altos, reproductibilidad alta y aplicación lenta y cara (Becerra y Paredes, 2000).

RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

El análisis fue descrito por primera vez en 1990 por dos grupos de investigadores (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990). Las reacciones de RAPDs (polimorfismos de ADN amplificadas al azar) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies, se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma usando la técnica llamada PCR (acrónimo del inglés que significa *polymerase chain reaction*), o reacción en cadena de la polimerasa, en la cual a partir de una pequeña cantidad de ADN se generan múltiples copias del mismo. Presenta polimorfismo medio-alto, estabilidad ambiental alta, número de loci alto, reproductibilidad moderada-alta y rápida y cara (Becerra y Paredes, 2000).

AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphism*)

Combinación de los principios de los RFLP y PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN, amplificadas selectivamente en cascada. Los AFLPs usan como partidores oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN digerido, el polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos y son normalmente, al igual que RAPD, de herencia dominante.

Es una técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, MseI que reconoce y corta 4 pb y EcoRI que reconoce y corta 6 pb dentro de una secuencia, con la unión de secuencias específicas al nucleótido ligado a los extremos de los fragmentos de restricción y dos amplificaciones de PCR usando "primers" basados en las secuencias ligadas. Polimorfismo medio-alto, estabilidad ambiental alta, número de loci alto, reproducibilidad alta y aplicación lenta y cara (Becerra y Paredes, 2000).

Microsatélites o Repetición de Secuencias Simples (SSR-Simple Sequence Repeats).

Son secuencias de un máximo de 6 pares de bases repetidas varias veces, por ejemplo: AC (40) veces, AAT (8) veces, AAT (17) veces, que van seguidas de otras secuencias distintas dentro del genoma en organismos tanto procariotes como eucariotes. Los microsatélites están presentes en regiones codificadoras y no codificadoras de genes, las cuales se caracterizan por tener un alto grado de polimorfismo (Zane *et al.*, 2002). Muestran altos niveles de polimorfismo y pueden presentar interrupciones por secuencias no-repetitivas, se encuentran en regiones promotoras de los genes que ayudan a aumentar la expresión del gen, tienen la habilidad para enlazar proteínas, lo cual depende del número de repeticiones que tenga el microsatélite. Tienen polimorfismo alto, estabilidad ambiental alta, número de loci alto, reproductibilidad alta y su aplicación es lenta y cara (Becerra y Paredes, 2000).

2.3.2.2 Extracción de ADN

Proceso mediante el cual hay separación del ADN de un ser vivo de los demás elementos celulares a través del aislamiento del mismo. Se requiere de rompimiento de membrana celular con el fin de acceder al núcleo de la célula, al ingresar al citoplasma también se debe cribar la membrana nuclear para dejar libre el ADN, y por último es necesario protegerlo de enzimas que puedan degradarlo (ADNasas) para retirarlo completamente.

2.3.2.2.1 Colecta de los materiales en campo

El ADN es afectado por diversos factores durante la colecta como el transporte y el mal almacenamiento de los tejidos. Una de las principales amenazas de éste es la acción de las ADNasas, enzimas que cortan el ADN hasta destruirlo totalmente, limitando su análisis, las enzimas inician su acción inmediatamente después de la muerte o en el momento que se corta el tejido y degradan el ADN en pocas horas,

esto pueden inhibirse por acción de sustancias que bloqueen su actividad enzimática, con la desecación inmediata del tejido o por congelación a temperaturas muy bajas (menores a -20 grados Celcius) a las cuales la actividad enzimática se disminuye permitiendo la conservación del ADN (Palacio, 2013).

2.3.2.2.2 Técnicas para la conservación del material vegetal:

Deshidratación de tejido vegetal, se utiliza sílica gel, silicato que tiene la propiedad de absorber humedad y que suele incluir un indicador de azul de cobalto que permite conocer su capacidad de absorción (Azul indica que está en su plena capacidad de absorción y en la mitad que absorber agua va cambiando su coloración pasando por tonos morados hasta llegar a rosado indicando que está completamente hidratada).

El frío es la mejor opción para conservar los tejidos vegetales. El nitrógeno líquido, proporciona temperatura de -196°C, pero su costo, es elevado para conseguirlo y manejarlo lo hace una opción poco práctica. El hielo seco, está a -70°C proporcionando un ambiente de alrededor -20°C, su logística es un poco complicada por lo cual se recomienda utilizar sílica gel en lugar del hielo seco. Estos métodos solo inactivan las enzimas de manera temporal y solo hacen más lento el proceso (Palacio, 2013).

2.3.2.2.3 Etapas en la extracción de ADN

Las etapas para extraer ADN constan de una etapa de lisis, la cual consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR (Newsletter Microbial, 2013). Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación del ADN mediante un procedimiento químico son:

Lisis de las células o virus: Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos, se utilizan soluciones básicas, detergentes como el SDS o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN (Alejos *et. Al.*, s. a.). Muchas soluciones de lisis contienen EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las ADNasas (Sambrook et al. 1989). Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas permanecen en la solución y se separan del ADN por centrifugación.

Degradación de la fracción proteica: se degrada con la adición de una proteasa, la fracción proteica puede precipitarse mejor con sales como el acetato de amonio o acetato sódico. Se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación.

Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook et al. 1989). La fase acuosa y orgánica se separa por centrifugación lo que permite aislar al ADN de las proteínas. El fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico son solventes que se usan frecuentemente (Stulnig y Amberger 1994). Pero estos reactivos contaminan fácilmente el ADN, por lo cual se debe evitar tenerlos lejos de donde se está realizando la extracción para evitar la contaminación durante el proceso de purificación.

Purificación:

- **Precipitación del ADN:** como el ADN es insoluble en alcohol se puede precipitar con etanol o isopropanol frío y recuperar con una centrifugación, el alcohol del sobrenadante se lleva las sales añadidas previamente.
- **Lavado del pellet:** se realiza con lavados con etanol frío y centrifugaciones.
- **Recuperación:** el sedimento se puede resuspender en agua tampón tris después de ser secado totalmente.

2.3.2.2.3 Cantidad y calidad del ADN

Después de obtener el material genético, es indispensable determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que “la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas”. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta a 260 nm lo cual permite estimar su concentración mediante espectrofotometría, cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 µg/ml (Leninger 1975).

Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/ microlitro (ng/µl). En algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra el equipo proporciona directamente la concentración en ng/µl. Para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng se deben tener al menos, 5 ng/ul de ADN en cada muestra, si se recuperaron 50 µl, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 µg.

Las concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Alejos *et. Al.*, s. a.).

2.3.2.2.4 Comprobación de la calidad de ADN por electroforesis

Es importante conocer si el ADN obtenido está integro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa, si el ADN está integro,

se observa una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó, cuando el ADN está fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas (Alejos *et. Al.*, s. a.).

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una metodología de las más utilizadas en laboratorio en trabajos relacionados con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración (Fierro, s. a.).

La electroforesis en poliacrilamida tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que se pueden separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases, se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación. Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. El rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa (Fierro, s. a.).

2.3.3 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

K. Mullis, investigador de la Corporación Cetus, en 1985, inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionó en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular, se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, también de diagnóstico clínico.

La técnica permite multiplicar (amplificar) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde 50 hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas.

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, presenta algunos inconvenientes, como no ser una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para disminuir este problema se debe de optimizar la secuencia de los primers, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos.

2.3.3.1 Componentes de la PCR

- **ADN:** muestra de la cual queremos obtener una copia de un fragmento (ADN que queremos amplificar), se conoce como ADN molde.
- **ADN polimerasa:** enzima capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde. Esta reacción se lleva a cabo con un tampón apropiado para la enzima polimerasa. Se añaden cationes divalentes generalmente en Cloruro de magnesio como cofactores de la polimerasa.
- **Iniciadores de la reacción:** Las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN. Son necesarios por tanto moléculas (primers o primers) cortas (entre 10 y 30 bases) de ADN de cadena sencilla.
- **Nucleótidos libres:** necesarios para que la ADN polimerasa pueda crear una nueva cadena complementaria a la cadena molde, mediante la adición de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs). Los cuatro dNTPs sirven para construir las nuevas cadenas de ADN, las variaciones en su concentración afectan especificidad y fidelidad. Concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la enzima e incluso pueden llegar a inhibirla. Usando concentraciones desbalanceadas también

afecta la fidelidad, siendo las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos entre 0,2 a 1Mm (Rodríguez y Barrera, 2004). Los dNTPs pueden captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar siempre la misma relación (Bolívar *et. al.*, 2014).

- **Solución amortiguadora:** Se emplea, comúnmente, concentrada diez veces, por lo general incluye Tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y $MgCl_2$. Se recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales aumentan la especificidad y fidelidad de la reacción, como el dimetilsulfoxido (DMSO) añadido para disminuir la estructura secundaria del ADN (Lantz, *et. al.*, 2000), detergentes como el tween 20 o el Tritón X-100, que ayudan a estabilizar la enzima, y, finalmente, el polietilenglicol (PEG), el glicerol, la formamida, o la seroalbumina bovina, entre otros; aunque en ningún caso estos últimos son imprescindibles (Rodríguez y Barrera, 2004).
- **Magnesio:** Tiene una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de $MgCl_2$ debe optimizarse para cada ensayo en particular, debido a que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción, las concentraciones insuficientes de Mg^{+2} dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas (Sint, *et. al.*, 2012).

2.3.3.2 Etapas para un ciclo de reacción

- **Desnaturalización:** se realiza mediante un calentamiento a 94°C, la cadena de doble hélice del ADN logra separarse, es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, si la muestra tiene alto contenido de guaninas y citosinas es recomendable aumentar el tiempo. El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria (Rodríguez y Barrera, 2004).
- **Alineamiento:** El ADN polimerasas, necesita del grupo OH^- libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a

partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde. Mientras que un cebador (5´) es complementario a la secuencia del extremo 5´ de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3´ de la misma, pero en la cadena opuesta (Rodríguez y Barrera, 2004).

El alineamiento específico de ambos primers se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los primers con sitios apócrifos del ADN molde (Sint, 2012).

- **Extensión:** Con el ADN molde de cadena sencilla, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5´→ 3´ excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean. Esta etapa debe hacerse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) con lo cual de evitan alineamientos inespecíficos de los iniciadores (Rodríguez y Barrera, 2004). El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Comúnmente al finalizar todos los ciclos se realiza un último alargamiento por 5 min. a 72°C, para tener certeza de que todos los productos de amplificación están completamente terminados y tengan exactamente la misma longitud (Sint, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los datos estadísticos, México está en el tercer lugar mundial en superficie sembrada de chile, después de China e Indonesia. En México se cultivan alrededor de unas 1,500 hectáreas de chile manzano en campo abierto y 40,000 hectáreas en invernadero, en el Estado de México en promedio solo 5.73 hectáreas son para exportación a los Estados Unidos (SENASICA, 2014). Los rendimientos en México son de 14.11ton/h en promedio, el precio por kilo es de 14 pesos el más bajo y 30 pesos el precio más alto, con una relación beneficio costo de 1.5 pesos de ganancia por 1 peso invertido (SAGARPA, 2013), el chile manzano posee ciertas

particularidades como su forma y apariencia que lo hacen atractivo para el consumidor. La falta de conocimiento de la diversidad genética de la especie *C. pubescens* que ostentan los productores en sus parcelas limita el conocimiento sobre la distribución de diferentes colectas, así como estudios de caracterización que pueden ser la antesala del inicio de mejoramiento genético de mediano y largo plazo que genere variedades propias para la región (Latournerie, et. al., 2010), el desarrollo de nuevas variedades con características uniformes podría mejorar las ganancias económicas en la producción de esta hortaliza. Debido a esto se hace necesario caracterizar molecularmente la especie de chile manzano como un complemento a la descripción morfológica para el conocimiento de las diferencias entre genotipos. Es por ello que el objetivo de la investigación fue describir la diversidad morfológica y genética de 15 colectas de chile manzano, cultivadas en la región sur del Estado de México como una primera estrategia para la identificación de variabilidad genética de esta especie.

IV. HIPÓTESIS

Si existen diferencias morfológicas entre colectas de chile manzano entonces se observará variabilidad fenotípica y genotípica, las cuáles pueden permitir programas de mejoramiento genético.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Caracterizar morfológica y molecularmente 15 colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del Estado de México.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente de acuerdo a las guías del IPGRI y SNICS las colectas de *C. pubescens*.
- Caracterizar molecularmente a partir de ADN las colectas de *C. pubescens* con 19 primers microsatélites.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del experimento

La investigación se llevó a cabo en Centro Universitario UAEM Tenancingo, la caracterización morfológica se realizó en el invernadero que está ubicado a 18° 58' 05.53" de latitud norte y 99° 36' 50.51" de longitud oeste, y a una altitud de 2068 msnm (Figura 1), y la extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología molecular del mismo Centro Universitario.




Figura 1. Centro Universitario UAEM Tenancingo, Estado de México.

6.2 Material biológico

Se utilizaron 15 colectas de chile manzano, de los materiales a utilizar al menos 3 colectas presentan caracteres contrastantes (Cuadro 1), las cuales ya fueron caracterizadas en el Centro Universitario UAEM Tenancingo y 12 colectas más que fueron muestreadas en el mercado Riva Palacio de Tenancingo (Figura 2), la información sobre el lugar de procedencia de las colectas fue la proporcionada por

las señoras a las que se les compraron los chiles, el muestreo se realizó con señoras que no tienen un local establecido y solo llegan a vender lo que producen en traspatio en sus casas para las colectas procedentes de Santa Ana y Villa Guerrero. Las colectas de Coatepec Harinas se compraron en los puestos establecidos en el mercado eligiendo los vendedores que compran los chiles directo con los productores y saben su procedencia (Cuadro 2, Figura 2).

Cuadro 1. Colectas caracterizadas en el Centro Universitario UAEM Tenancingo

| COLECTA | PROCEDENCIA | ALTITUD |  |
|------------|---|-----------|--|
| C12 | El Zarco, Tenancingo Estado de México. | 2200 msnm | |
| C11 | Coatepec Harinas, Estado de México | 2250 msnm | |
| C3 | Coatepec Harinas, Estado de México | 2250 msnm | |

C12= flor blanca entrenudos cortos; C11=flor morada entrenudos cortos; C3= flor
entrenudos largos.

morada



Figura 2. Colectas muestreadas en el mercado Riva Palacio, Tenancingo Estado de México.

Cuadro 2. Localización y descripción de las colectas 12 colectas muestreadas en el Mercado Riva Palacio, Tenancingo Estado de México

| COLECTA | LOCALIZACIÓN | ALTITUD | DESCRIPCIÓN |
|---------|------------------------------|-----------|----------------------------|
| C1 | San Bartolo, Villa Guerrero. | 2440 msnm | Fruto rojo tres lóculos |
| C2 | Coatepec Harinas | 2250 msnm | Fruto rojo dos lóculos |
| C4 | Villa Guerrero | 1767 msnm | Fruto naranja dos lóculos |
| C5 | Santa Ana, Tenancingo | 2200 msnm | Fruto naranja tres lóculos |
| C6 | Santa Ana, Tenancingo | 2200 msnm | Fruto naranja tres lóculos |
| C7 | Santa Ana Tenancingo | 2200 msnm | Fruto naranja tres lóculos |
| C8 | Santa Ana, Tenancingo | 2200 msnm | Fruto rojo dos lóculos |
| C9 | Villa Guerrero | 1767 msnm | Fruto rojo tres lóculos |
| C10 | Coatepec Harinas | 2250 msnm | Fruto naranja tres lóculos |
| C13 | Coatepec Harinas | 2250 msnm | Fruto rojo tres lóculos |
| C14 | Santa Ana, Tenancingo | 2200 msnm | Fruto naranja tres lóculos |
| C15 | Villa Guerrero | 1767 msnm | Fruto naranja tres lóculos |

6.3 Siembra y trasplante de las colectas

La semilla se germinó en charolas negras de polietileno de 72 cavidades con Peat moos y zeolita con una relación 9:1, a razón de una semilla por cavidad y a una profundidad de 0.5 cm; se colocaron 36 semillas por colecta y dos colectas por charola. Una vez germinada la semilla, las plántulas de seis hojas verdaderas se trasplantaron a bolsas de plástico negro de 45 litros de capacidad con sustrato compuesto de lombrihumus (10%), tezontle cernido.

6.5 Manejo agronómico

Las plantas se establecieron en condiciones de invernadero tipo cenital con plástico con 20% de sombra y malla sombra que en conjunto proporcionaron una intensidad lumínica de $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (30,000 luxes) (Ruiz, 2012). Se establecieron 10 plantas de cada colecta, las cuales fueron dispuestas a una distancia de 1m entre bolsas a tres bolillo. El arreglo de plantas de las colectas fue completamente aleatorizado.

El suministro de agua y fertilización fue provisto por sistema de riego por goteo. La nutrición fue determinada de acuerdo a la solución propuesta por Steiner (1984), el

pH se bajó a 5.5 con ácido sulfúrico 3N (Cuadro 3) y se aplicó en fertirriego con un volumen de 300 ml dosificados en tres riegos hasta antes de la floración; y de 500 ml dosificado en tres riegos al día en desarrollo de fruto.

Cuadro 3. Cantidad de fertilizante utilizado para preparar 10000 litros de solución nutritiva para plantas de chile manzano establecidas en bolsa e invernadero, determinadas según Stainer (1984)

| Fuente | Cantidad (g) |
|---------------------|---------------------|
| Nitrato de potasio | 990 |
| Nitrato de calcio | 3550 |
| Fosfato monoamónico | 450 |
| Sulfato de magnesio | 1640 |
| Sulfato de potasio | 880 |
| Microelementos | 2000 |

6.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La caracterización morfológica se realizó de acuerdo a la guía “Descriptores para *Capsicum* spp”, del IPGRI (1995) de la cual se tomaron 69 descriptores (Ver anexos) y de la guía técnica para la descripción varietal de chile *Capsicum annuum* (SNICS, 2013) de la cual se tomaron 18 descriptores complementarios a la primer guía (Ver Anexos 3 y 4, Cuadro 27 y 28).

6.6.1 Plántula

Para los caracteres cuantitativos como longitud y ancho de la hoja cotiledónea fueron registrados en (cm) cuando el brote terminal media de 1 a 2mm de ancho en las tres colectas. En los caracteres cualitativos se tomó como referencia un esquema para forma de hoja cotiledónea (Anexo 1, Figura 21), para color de hipocótilo, pubescencia del hipocótilo y color de la hoja cotiledónea se utilizaron escalas de la guía IPGRI (1995), (Ver Anexo 1, Cuadro 28).

6.6.2 Planta

Los datos se tomaron cuando la planta estaba con un inicio de floración en por lo menos el 50% de las plantas evaluadas. Para longitud de tallo y diámetro de tallo se tomó como referencia medir antes de la primera bifurcación, el descriptor altura de la planta se tomó de plantas maduras identificadas por inicio de floración y el ancho fue medido en la parte más ancha de la planta. Para caracteres como ciclo de vida, color del tallo, antocianina del nudo, forma del tallo, densidad de ramificación, macollamiento, densidad de hojas, color de la hoja y margen de la lámina foliar se tomaron como referencia escalas (Anexo 4, Cuadro 28), para pubescencia del tallo, hábito de crecimiento de la planta, forma de la hoja y pubescencia de la hoja se tomaron como referencia esquemas (Anexo 4, Figura 22), de la guía IPGRI (1995). Para el carácter hábito de crecimiento, entrenudos cortos en la parte superior y ampollado de la superficie de la hoja se tomó como referencia escalas (Anexo 4, cuadro 28) de la guía del SNICS (2014).

6.6.3 Flor

Los datos se tomaron en flores abiertas al momento de la anthesis durante el primer flujo de floración, los días a floración son de la siembra hasta que el 50% de la población presentaba por lo menos una flor abierta. La longitud de la antera y filamento se midió inmediatamente a la anthesis, el número de flores por axila, color de la corola, color de la mancha de la corola, forma de la corola, color de las anteras, color del filamento, exserción del estigma, esterilidad masculina y pigmentación del cáliz se tomó como referencia escalas (Anexo 4, Cuadro 28) y para posición de la flor, margen de cáliz y constricción anular del cáliz se tomaron de esquemas (Anexo 4, Figuras 26, 27 y 28) de la guía IPGRI (1995).

6.6.4 Fruto y semilla

Los datos se tomaron en frutos maduros, el periodo de fructificación inicio cuando el 50% de las plantas presentaron por lo menos un fruto maduro y se inició a contabilizar del 01 de Octubre de 2015 al 8 de diciembre de 2015 (aproximadamente 2 meses), debido a que en estos dos últimos meses la producción ceso por las bajas temperaturas. Para el descriptor prendimiento del fruto se tomaron los días que se hace una flor después de abierta en tener un fruto de por lo menos 1cm de diámetro. Para las mediciones de ancho y largo de fruto, grosor del pericarpio, longitud de la placenta y grosor del pedúnculo, se realizó un calibrador vernier. El peso de fruto se tomó con una balanza analítica (Figura 3). Para los descriptores manchas o rayas antocianinicas, color del fruto en estado intermedio, color del fruto en estado maduro, cuajado del fruto, tipo de epidermis del fruto, persistencia en frutos maduros del pedicelo con el fruto y pedicelo con el tallo y condición de la mezcla varietal se tomó como referencia escalas (Anexo 4, Cuadro 28) y para forma del fruto en la unión con el pedicelo, cuello en la base del fruto, forma del ápice del fruto, apéndice del fruto, vestigio de la floración, relación ancho-largo del fruto y arrugamiento transversal del fruto con esquemas (Anexo 4, Figuras 30, 31, 32, 33 y 34) de la guía IPGRI (1995). Para los caracteres posición del pedúnculo, sabor del fruto, brillantez del fruto, profundidad de la depresión interocular, posición del fruto y forma predominante de la sección longitudinal se tomó de como referencia escalas, para la forma del fruto se tomaron esquemas de la guía del SNICS (2014; Anexo 1, cuadro 16, Figura 35).

Para los descriptores de la semilla se tomaron los datos en semillas frescas. Los datos de tamaño y diámetro de la semilla se tomaron con un calibrador vernier, el peso de 100 semillas se tomó en una báscula analítica, en semillas de frutos recién colectados. El color de semilla, superficie de la semilla se tomó como referencia escalas (Anexo 4, Cuadro 28) de la guía del IPGRI (1995).

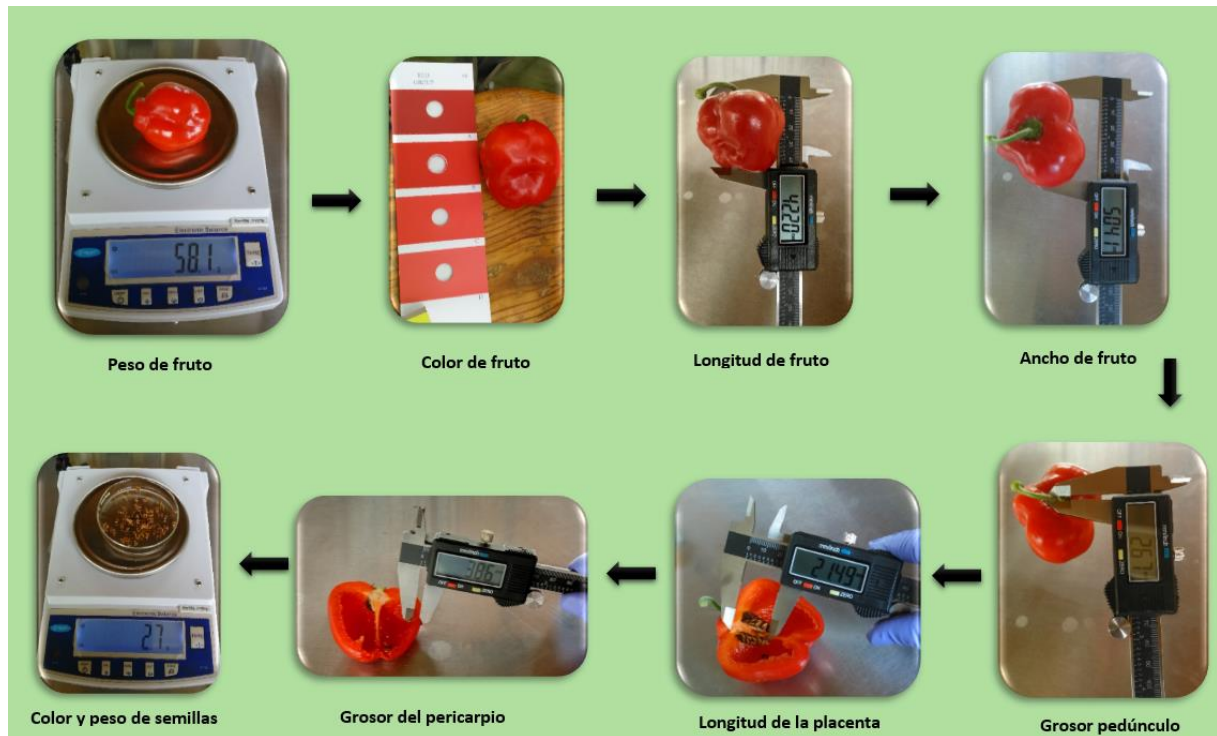


Figura 3. Medición de caracteres en fruto de 15 colectas de Chile Manzano.

6.7 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La caracterización molecular se inició en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario UAEM Tenancingo. Las muestras del material se tomaron en el invernadero del mismo Centro Universitario y la extracción de ADN se realizó con un kit comercial (Analytikjena de BIOMETRA) siguiendo los pasos del mismo.

6.7.2 Colecta del material vegetal.

Las muestras fueron tomadas de hojas jóvenes totalmente abiertas y fotosintéticamente activas colocadas en un pedazo de aluminio debidamente etiquetado, posteriormente fueron introducidas en un termo con nitrógeno líquido y transportadas al laboratorio.

Se realizó la maceración del tejido en morteros con nitrógeno líquido; las muestras maceradas se colocaron en tubos eppendorf etiquetados con el número de colecta y se guardaron en el ultracongelador de -80°C (Figura 4).



Figura 4. Colecta de muestras y molienda con nitrógeno líquido de 15 colectas de chile manzano.

6.7.3 Extracción de ADN con Kit comercial Analytikjena de Biometra

1. Se prepararon las soluciones del kit de acuerdo al manual.
2. A la muestra homogenizada se le colocaron 400 microlitros de la solución LS se pasó al vortex y se agregó proteinsa K para cada una de las colectas
3. Se dejaron incubar en un baño María a 50 ° C por 30 minutos.
4. Pasados los 30 minutos se extrajo el sobrenadante y se transfirió al filtro morado con un tubo receptor y se centrifugó a 12000 revoluciones por un minuto.
5. Pasado el minuto se retiró el filtro morado y se agregaron 200 microlitros de la solución SBS, se pipeteo por inversión.
6. La solución resultante se pasó a un filtro verde con su tubo receptor y se centrifugó a 12000 revoluciones por dos minutos.
7. Pasados los dos minutos se desechó el tubo receptor y el filtro verde se colocó en un tubo receptor nuevo y se le agregaron 500 microlitros de la solución HS, se centrifugó a 12000 revoluciones por un minuto.
8. Pasado el minuto se desechó de nuevo el tubo receptor y el filtro verde fue colocado en un receptor nuevo al que le fue agregado 750 microlitros de la solución MS, se centrifugo a 12000 revoluciones por un minuto
9. El filtro verde se colocó en un tubo eppendorf nuevo y etiquetado y se centrifugo por dos minutos a máxima velocidad para retirar los residuos de etanol.
10. Se desechó el tubo eppendorf y el filtro fue colocado en uno nuevo, se le agregaron 200 microlitros de Elution Buffer, se incubaron a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugaron a 8000 revoluciones por un minuto.
11. Pasado el minuto se desechó el filtro verde y el ADN extraído se guardó en el refrigerador de -20 ° C.



Figura 5. Kit comercial Analytikjena de Biometra

6.7.3 Evaluación de ADN con electroforesis

Se evaluó la calidad de ADN mediante un corrimiento de ADN en gel de agarosa al 1.5%, con los siguientes pasos.

6.7.3.1 Preparación del gel de agarosa

1. Se preparó el gel de Agarosa al 1.5% (3 g de agarosa en 200 ml de Buffer TBE), se metió al horno durante dos minutos para que se mezclara la agarosa con el agua hasta que quedo un líquido transparente sin grumos, cuando la preparación se tibio se le agregaron 4 microlitros de Gel Red® colorante inocuo que sirve para la tinción de ADN en electroforesis.
2. Se incorporó el gel líquido al portageles de la cámara de electroforesis con sus lados sellados con masking tape y se removió el peine.
3. Posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis y se le agrego Buffer TBE hasta cubrir el gel.



Figura 6. Gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE.

6.7.3.2 Preparación de la muestra de ADN y electroforesis

1. Se colocó un trozo de papel encerado, en el cual se colocaron 2 microlitros de LOADDAY, 2 de agua destilada estéril y 3 microlitros de ADN, se pipeteo por inmersión.
2. Posteriormente se cargó en la cámara de electroforesis cada muestra en los pozos del gel (Figura 7).
3. En el primer pozo se colocó una escalera marcador de ADN de 100pb, la cual sirvió para estimar la longitud de los fragmento (Figura 7).
4. En los siguientes pozos se colocaron las 15 muestras de ADN.
5. Se tapó la cámara y se conectó a la fuente de poder la cual se programó a 100 volts por 90 minutos.



Figura 7. Carga de muestras de ADN en gel de agarosa y corrimiento del ADN en la cámara para electroforesis y regulador de voltaje.

6.7.3.3 Visualización del ADN en el fotodocumentador de geles

1. Pasado el tiempo la cámara de electroforesis se retiró el gel y se pasó al fotodocumentador de geles.
2. Se encendió la computadora, se prendió el transluminador, la cámara y la luz UV y en el programa se visualizó la imagen y se tomó la fotografía (Figura 8).



Figura 8. Visualización del ADN con fotodocumentador de geles

6.7.3.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN fue determinada por espectrofotometría (NanoDrop 100) calculada a través de la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se obtuvo mediante la relación A260/A280 y A260/A230.

6.7.4 Marcadores moleculares microsatélites

La información se obtuvo de los artículos de Sanwen et al. (2001) y de Lee et al. (2004) que permitió la obtención de 6 (Cuadro 4) y 13 primers, respectivamente citados por Media y colaboradores 2006 (Cuadro 5).

Cuadro 4. Secuencias de 6 primers para *Capsicum* tomados de Sanwen et al., 2001.

| consecutivo | marcador | | Secuencia del cebador | Pb | T°C |
|-------------|----------|---|-------------------------|----|------|
| S1 | (AT)5 | F | GCAAAAGTGATGATTCATAAA | 21 | 53.1 |
| | | R | TCACCTTCAAAGATTCTTAACAC | 23 | 53.2 |
| S2 | (AT)6 | F | GTACCTATGGGAATAAGCAA | 21 | 53.7 |
| | | R | CCAATTTGTCTGAAGTTGAGT | 21 | 54.4 |
| S3 | (AGG)5 | F | GAAGAAGCCAGTAGAGGAGA | 20 | 53.8 |
| | | R | CAGCACCTTGAAGATGTAGAT | 21 | 54.5 |
| S6 | (AG)5 | F | AGTTAACAACCTTTGGTGCTGT | 21 | 54.2 |
| | | R | TAATATGGTAAGCACATTCCA | 21 | 53.4 |
| S7 | (AG)6 | F | TGTTCTCTCTCTTCTTATCG | 21 | 53.9 |
| | | R | CCGGAGATAAGATCTTGATAA | 21 | 53.7 |
| S8 | (ATATA)5 | F | ATAGCTCACATGCCCTATAAA | 21 | 54.3 |
| | | R | AATCTTGAGCAATAATTGGAC | 21 | 53.6 |

Pb y T°C =información suministrada por el fabricante.

Cuadro 5. Secuencias de 13 primers para *Capsicum* tomados de Umesh Reddy², 2004.

| consecutivo | | Secuencia del cebador | Pb | T°C |
|--------------------|---|--------------------------------|-----------|------------|
| U1 | F | GAA GCC AAA AAT AGG AAC G | 19 | 52.4 |
| | R | CCC GCT TGA GAT CTT GGA T | 19 | 56.7 |
| U2 | F | GCA CAT TCA AGC TAG GCG CAG | 21 | 61.8 |
| | R | GGG TGC ATG ATA TTA TGT GAG | 21 | 55.9 |
| U3 | F | CTT AAG GGA CGT GAA CAA TTG | 21 | 55.9 |
| | R | CTG TCA CAT ATT CAT GCA TC | 20 | 53.2 |
| U4 | F | CAT CCA AAC CCT AAT TCC ATC | 21 | 55.9 |
| | R | CTT TGG CTC TGA TAC CAA GCT TG | 23 | 60.6 |
| U5 | F | GAT CTC AGT TCT ATC TAG CGG G | 22 | 60.3 |
| | R | CAG CCA ATC AGT TCA GTT TAG TG | 23 | 58.9 |
| U6 | F | CAG AAT GAC CGA AT | 14 | 40 |
| | R | GAT ATA CTT TAC CTG AC | 17 | 54.5 |
| U8 | F | GGC ATA GTT TTG CTT GTG AC | 20 | 55.3 |
| | R | CGA ATA CAT CTA TTG TGA CC | 20 | 53.2 |
| U9 | F | CCC TCT TCA ATC CAA ATC AAC C | 22 | 58.4 |
| | R | CGT AGT CAG ATG TTG AAG TCG C | 22 | 60.3 |
| U10 | F | CTT CCG TTC AAA CTT GTC TGC | 21 | 57.9 |
| | R | GGT TTG CAT ACA CTT GAC CCT C | 22 | 60.3 |
| U11 | F | GGA GCT TCT CTT GAT AGA CAT C | 22 | 58.4 |
| | R | CCC AGA CCA CAC TAT GTG | 18 | 56 |
| U13 | F | CGG TGA ATG GAC TGT CAT C | 19 | 56.7 |
| | R | CAC GAT GCT CCT TGG AGT | 18 | 56 |
| U16 | F | GCG ATT ACA AAG TAC GAG TAG | 21 | 55.9 |
| | R | GAA TCA TGA CTT AGA GTT GGC AG | 23 | 58.9 |
| U20 | F | CAT TTT CCT CAT GGG TCA C | 19 | 54.5 |
| | R | GTC GAC CAA TTG AGA AGT C | 19 | 54.5 |

Pb y T°C =información suministrada por el fabricante.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los 59 caracteres cualitativos se obtuvo la moda (estadística descriptiva) y para los 27 cuantitativos se realizó un análisis de varianza y comparación de medias, además de un análisis de taxonomía numérica con un estudio de estados únicos para caracteres cualitativos, morfoalelos totales y polimórficos para los 86 descriptores evaluados, los cuales se clasificaron en diferentes categorías: cualitativas binarias, cualitativas multiestado con orden lógico, cualitativas multiestado sin orden lógico, cuantitativas continuas y cuantitativas discontinuas, de acuerdo con la categorización propuesta por Crisci y López (1983). Análisis multivariados (discrimínate y dendograma para los 86 descriptores evaluados y análisis de componentes principales para los 27 cuantitativos evaluados) con el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et. al.*, 2016).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CARACTERIZACION MORFOLÓGICA

7.1.2 Resultados comparación de medias, análisis de varianza y moda

7.1.2.1 Plántula

Se evaluaron seis caracteres en plántula dos cuantitativos y cuatro cualitativos (ver anexos 4), en caracteres cuantitativos la colecta cuatro y 14 presentan diferencias altamente significativas en ancho de hoja cotiledónea siendo la de mayor ancho la colecta 14 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de medias en largo y ancho de hoja cotiledónea en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Colecta | Longitud hoja cotiledónea | Ancho de hoja cotiledónea |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 1 | 2.55 |
| 2 | 1.05 | 3.05 |
| 3 | 1 | 2.7 |
| 4 | 1.05 | 2.3** |
| 5 | 1 | 2.85 |
| 6 | 1 | 3.25 |
| 7 | 1 | 2.85 |
| 8 | 1 | 3.2 |
| 9 | 1 | 3 |
| 10 | 1 | 2.75 |
| 11 | 1 | 2.75 |
| 12 | 1.05 | 2.85 |
| 13 | 1.2 | 3.2 |
| 14 | 1 | 3.45** |
| 15 | 1 | 3.05 |
| CV | 14.24 | 16.67 |
| p | 0.0012 | 0.0001 |

CV= coeficiente de variación, p= probabilidad Tukey <0.01 y

** valores altamente significativos.

De los caracteres cualitativos evaluados en color de hipocótilo la colecta 12 es la única que presenta color verde de hipocótilo comparada con las demás que lo

presentan color morado (Figura 9), en pubescencia de hipocótilo no presentaron muchas diferencias el 87% de las colectas presentaron pubescencia intermedia y solo las colectas 11 y 12 presentaron pubescencia escasa, 13 de las 15 colectas evaluadas presentan color de hoja verde claro y color las colectas 10 y 14 color verde, para el caracter forma de la hoja 12 colectas presentaron forma lanceoladada y las colectas seis, ocho y nueve forma elongada-deltaide (Cuadro 7).



Figura 9. Color de hipocótilo 1) color verde colecta 12 y 2) color morado colecta tres

Cuadro 7. Moda en cuatro caracteres cualitativos en plántula observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Carácter/Colecta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | Descripción |
|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|--------------------------------------|
| Color del hipocótilo | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2-verde y 3 -morado |
| Pubescencia del hipocótilo | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5- intermedia y 3- escasa |
| Color hoja cotiledónea | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1-verde claro y 2-verde |
| Forma hoja cotiledónea | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3- lanceolada y 4- elongada-deltaide |

7.1.2.2 Planta madura

Se evaluaron 24 caracteres en planta ocho cuantitativos y 16 cualitativos de los cuales cinco son de la guía del SNICS y están marcados con un asterisco y 19 de la guía del IPGRI. El análisis de comparación de media muestra que para longitud de tallo las colectas 12, 13 y 14 son las que presentan diferencias altamente significativas siendo la colecta 14 la que presenta la mayor longitud del tallo y la 12 la menor longitud con una diferencia en promedio de 20cm aproximadamente entre estas. Para diámetro del tallo las colectas 12 y 13 presentan diferencias altamente significativas siendo la 12 la de menor diámetro (Cuadro 8).

En longitud de hoja se encontraron diferencias significativas en las colectas 10 y 6, para ancho de hoja las colectas que tuvieron diferencias altamente significativas fueron las colectas cinco y siendo la tres la que presentó el mayor ancho de hoja, para longitud de pedicelo la colecta dos presentó la mayor longitud y la siete la menor longitud presentando estas dos diferencias altamente significativas (Cuadro 8).

En ancho de la planta las colectas tres y once presentaron diferencias altamente significativas en comparación con las demás siendo la once la que presenta el mayor ancho de planta, para longitud de la planta la colecta 14 presenta el mayor tamaño lo que coincide con la longitud de tallo siendo esta también la de mayor tamaño, la colecta dos presenta el menor tamaño con 30 cm menos en promedio comparada con la 14. En longitud de brotes primarios las colectas dos y cinco presentan diferencias altamente significativas comparadas con las demás y la colecta cinco es la que presenta la mayor longitud en brotes primarios (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias en ocho caracteres cuantitativos observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| colecta | L. tallo | D. tallo | L. hoja | A. hoja | L. planta | A. planta | L. B. P.* | L. pedicelo* |
|-----------|----------|----------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| 1 | 17.4 | 13.07 | 16.2 | 8.2 | 110.4 | 71.6 | 9.4 | 2.53 |
| 2 | 18.55 | 13.38 | 17.2 | 10.5 | 105.8** | 68.6 | 4.4** | 3.83** |
| 3 | 17.8 | 14.63 | 17.8 | 10.61** | 121.4 | 61.9** | 5.9 | 2.21 |
| 4 | 14.4 | 13.53 | 16.8 | 8.96 | 125.1 | 90.5 | 9.5 | 2.19 |
| 5 | 14.65 | 12.47 | 16.4 | 7.6** | 128.2 | 79.2 | 9.9** | 3.19 |
| 6 | 10.77** | 14.85 | 18* | 9.25 | 125.8 | 81.1 | 6.6 | 2.83 |
| 7 | 20.4** | 13.76 | 17 | 9.57 | 121.4 | 66.4 | 6.5 | 1.96** |
| 8 | 12.55 | 13.93 | 16.7 | 8.09 | 112.8 | 96.2 | 7.8 | 2.12 |
| 9 | 17.65 | 12.63 | 15.9* | 9.95 | 113.5 | 83.9 | 4.6 | 3.31 |
| 10 | 18.65 | 14.78 | 16.6 | 10.25 | 113.1 | 74.8 | 5.2 | 2.62 |
| 11 | 12.4 | 12.17 | 16 | 8.65 | 114.1 | 96.2** | 7.4 | 2.9 |
| 12 | 12.85 | 10.79** | 16.2 | 7.78 | 130.1 | 89.2 | 7 | 2.36 |
| 13 | 18.15 | 14.93** | 16.5 | 8.44 | 136.5 | 80.8 | 7.6 | 2.62 |
| 14 | 30.5** | 14.09 | 17.3 | 9.75 | 140.9** | 72.2 | 7.9 | 2.69 |
| 15 | 20.45 | 13.95 | 17.1 | 9.47 | 118.7 | 75.4 | 6.2 | 2.43 |
| CV | 25.16 | 13.33 | 8.69 | 10.33 | 10.58 | 18.63 | 30.57 | 19.43 |
| p | 0.0001 | 0.001 | 0.04 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 |

CV= coeficiente de variación, p= probabilidad Tukey <0.01, ** valores altamente significativos, * valores significativos, L= longitud, D= diámetro, A= ancho y L. B. P.= longitud en brotes primarios.

Las colectas de chile manzano presentan ciclo de vida perenne, forma cilíndrica del tallo, crecimiento dicotómico del tallo, ampollado medio de la hoja, presencia de entrenudos acortados en la parte superior y margen de la lámina foliar entera, para los caracteres antocianina del nudo y color del tallo la colecta 12 es la única que presenta color verde y las demás morado o verde con rayas purpura (Cuadro 9).

El color de hoja se tomó con la tabla de colores (The royal horticultural Society, Green Group), de las cuales se tomaron 3 escalas (Cuadro 8), el 46.6% de las colectas entro en la categoría 1 (137A), el 26.6% en la categoría 2 (137B) y el 26.6% en la 3 (137C), los colores se muestran en la figura 10, todas entran en un mismo grupo pero con diferentes tonalidades.

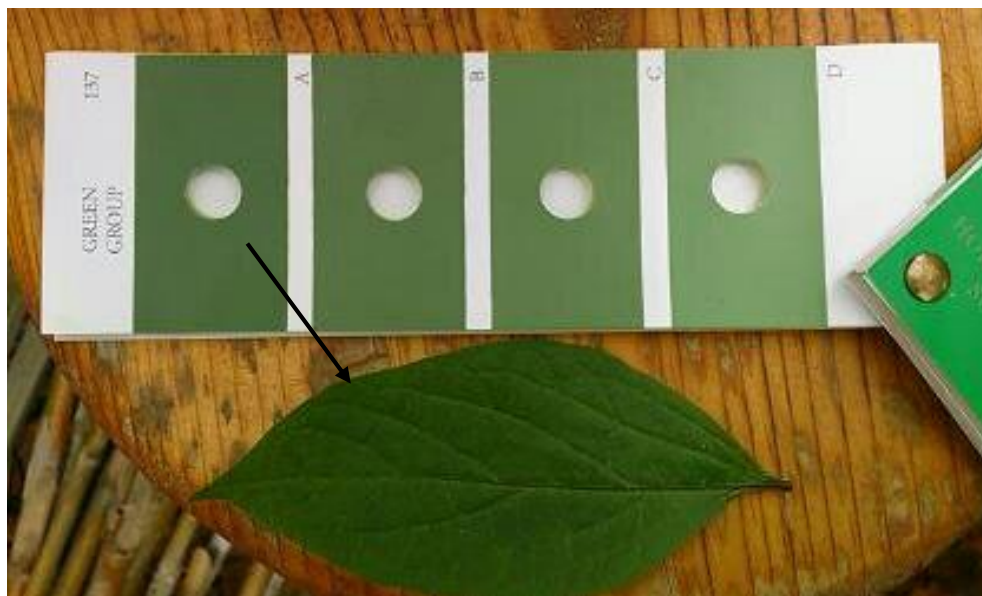


Figura 10. Tabla de color con las que se tomó el color de hoja.

En pubescencia del tallo el 60% de las colectas presentan pubescencia intermedia y el 40% densa, para el caracter hábito de crecimiento las colectas 11 y 12 presentan hábito intermedio de crecimiento y las demás erectos, Solanki y colaboradores (1986), mencionan que al ser compacta o erecta la planta tendrá mayor número de ramas principales y que correlaciona positivamente con el rendimiento. Para los caracteres densidad de ramificación y macollamiento la colecta ocho es la única lo que presenta denso. En densidad de hojas el 80% de las colectas presentan densidad intermedia de hojas y el 20% denso siendo estas las colectas ocho, 11 y 12. La colecta 13 presenta forma de hoja deltoide y para pubescencia de la hoja solo en la colecta 12 es escasa diferenciándola de las demás (Cuadro 9), Smith y Heiser (1957), mencionan que para *Capsicum*, hay mayor cantidad de plantas con hojas de pubescencia escasa, pero si se le suman las intermedias y las densas la proporción es igual.

Cuadro 9. Moda en 16 caracteres cualitativos en planta observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Descriptor /Colecta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | Descripción |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|--|
| color de hoja | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1-137A, 2-137B Y 3-137C (GREEN GROUP) |
| ciclo de vida | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | perene |
| antocianina nudo | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 5 | 5 | 5 | 1-verde y 5-morado |
| color tallo | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1- verde, 2- verde con rayas purpura y 3- morado |
| forma del tallo | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | cilíndrico |
| pubescencia del tallo | 5 | 7 | 7 | 5 | 7 | 7 | 5 | 5 | 7 | 5 | 5 | 5 | 7 | 5 | 5 | 5- intermedia y 7-densa |
| hábito de crecimiento | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 5 | 5 | 7 | 7 | 7 | 5- intermedia y 7-erecta |
| densidad de ramificación | 5 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 7 | 5 | 3 | 5 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3-escasa, 5-intermedia y 7-densa |
| mocollamiento | 3 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 3 | 7 | 3 | 3 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3-escasa, 5-intermedia y 7-densa |
| densidad de hojas | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 7 | 5 | 5 | 7 | 7 | 5 | 5 | 5 | 3-escasa, 5-intermedia y 7-densa |
| forma de la hoja | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1-deltoide, 2 oval y 3-lanceolada |
| margen la lámina foliar | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | entera |
| pubescencia de la hoja | 5 | 7 | 7 | 7 | 5 | 7 | 5 | 5 | 7 | 5 | 5 | 3 | 7 | 7 | 5 | 3-escasa, 5-intermedia y 7-densa |
| habito de crecimiento* | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | dicotómica |
| ampollado de la hoja* | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | medio |
| entrenudos acortados* | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | presente |

7.1.2.3 Flor

En flor se evaluaron 16 caracteres de la guía IPGRI (1995), de los cuales cuatro son cuantitativos y 12 cualitativos. En longitud de la corola las colectas uno y 8 presentan diferencias altamente significativas siendo la colecta dos la de mayor longitud y la ocho la que presenta la menor longitud seguida de la colecta 12 (Cuadro 10).

En longitud de antera y longitud de filamento no hubo diferencias significativas; para días a floración después de siembra 15 presenta el menor número de días a floración (132) y las colectas siete y ocho las que tardaron más en iniciar su floración (146) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de medias en cuatro caracteres cuantitativos de flor observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| COLECTA | Longitud corola | Longitud antera | Longitud filamento | Días a floración |
|---------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|
| 1 | 1.88** | 0.22 | 0.43 | 140 |
| 2 | 1.62 | 0.21 | 0.42 | 143 |
| 3 | 1.44 | 0.21 | 0.46 | 141 |
| 4 | 1.32 | 0.22 | 0.43 | 140 |
| 5 | 1.49 | 0.24 | 0.46 | 141 |
| 6 | 1.33 | 0.22 | 0.44 | 143 |
| 7 | 1.35 | 0.22 | 0.42 | 146** |
| 8 | 1.18** | 0.22 | 0.42 | 146** |
| 9 | 1.45 | 0.22 | 0.42 | 141 |
| 10 | 1.33 | 0.2 | 0.41 | 136 |
| 11 | 1.28 | 0.22 | 0.42 | 140 |
| 12 | 1.23 | 0.2 | 0.4 | 139 |
| 13 | 1.38 | 0.23 | 0.43 | 139 |
| 14 | 1.4 | 0.23 | 0.45 | 144 |
| 15 | 1.39 | 0.21 | 0.42 | 132** |
| CV | 24.34 | 16.6 | 10.59 | 4 |
| p | 0.0001 | 0.03 | 0.009 | 0.0001 |

CV= coeficiente de variación, p= probabilidad Tukey <0.01, ** valores altamente significativos.

Las colectas de chile manzano presentan posición de flor erecta, mancha de la corola blanca, forma redonda de la corola, esterilidad masculina y pigmentación del cáliz ausentes, presencia de constricción anular del cáliz y en promedio una flor por axila en promedio (Cuadro 11), la característica flores por axila, es una de las variables más importantes para diferenciar morfotipos, donde la condición de la flor solitaria es de herencia simple y dominante, por lo cual se puede utilizar como una característica discriminante (Andrews, 1995).

El color de la corola para la mayoría de las colectas es morado con la base blanca y solo la colecta 12 presenta color blanco de corola lo que la diferencia de las demás y es en flor en donde se notan la mayoría de lo que diferencia esta colecta de las demás ya que es la única que presenta color de anteras amarillo y color de filamento blanco comparándola con las otras colectas que el color de anteras y filamento son de color morado (Figura 11).



Figura 11. Color de la corola de 15 colectas de chile manzano

Para el carácter exserción del estigma, el 53% de las colectas presentó el estigma excerto, característica que favorece la polinización cruzada que ocurre en flores cuyos estigmas son más altos que el nivel de los estambres (IPGRI, 1983), el 27% de las colectas lo presenta al nivel y el 10% inserto donde están las colectas dos y 12, sin embargo las colectas que presentan tanto inserto como excerto el estigma es relativamente muy poco lo que sobresale de las anteras aproximadamente 1 o 2mm arriba o debajo de las anteras lo que sigue favoreciendo la autopolinización en esta especie (Cuadro 11), comparada con *Capsicum annum* como la flor de chile huacle que está muy por encima el estigma de las anteras y se favorece la polinización cruzada que su estigma (Figura 12).



Figura 12. Estigma excerto de la flor de chile huacle (*Capsicum annum* L.), foto del artículo (López y Pérez 2015)

Cuadro 11. Moda en 12 caracteres cualitativos de flor observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Descriptor/ Colecta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | Descripción |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|-------------------------------------|
| posición de la flor | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | erecta |
| color de la corola | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 5 | 5 | 5 | 1- blanco y 5- morado base blanca |
| mancha de la corola | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | blanca |
| forma de la corola | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | redonda |
| color de las anteras | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 5 | 5 | 2- amarillo y 5- morado |
| color del filamento | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 1 | 6 | 6 | 6 | 1-blanco y 6- morado |
| exserción del estigma | 7 | 3 | 7 | 7 | 7 | 7 | 5 | 7 | 5 | 5 | 7 | 7 | 3 | 7 | 5 | 3- inserto, 5- al nivel y 7-excerto |
| esterilidad masculina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ausente |
| pigmentación del cáliz | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ausente |
| margen del cáliz | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | dentado |
| constricción anular del cáliz | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | presente |
| número de flores por axila | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | una |

7.1.2.4 Fruto

Se evaluaron 34 caracteres de fruto de los cuales 13 son de la guía del SNICS (2014) de estos 12 son cualitativos y uno cuantitativo los cuales están marcados con un asterisco y de la guía del IPGRI (1995) se evaluaron 21 caracteres ocho cuantitativos y trece cualitativos. Se evaluaron 20 frutos de cada colecta.

La colecta que presentó mayor días en tener frutos maduros fue la colecta 15 con 166 días después de la siembra (dds) en promedio y la que tuvo frutos maduros en menos tiempo fue la colecta cuatro con 155 dds, la colecta con mayor periodo de fructificación durante el periodo evaluado del 01 de octubre de 2015 al 08 de diciembre del mismo año fue la colecta 12 con 69 días en promedio y la que menor periodo tubo fue la 3 ya que fue una de las que más tardaron en fructificar (Cuadro 12).

Para el peso del fruto la colecta que presentó el mayor peso en promedio fue la colecta 10 y la colecta de menor peso de fruto es las 12, ambas con valores altamente significativos, para el caracter ancho de fruto la colecta 10 presenta el mayor ancho de fruto, éste carácter morfológico es de alta capacidad heredable por lo que se recomienda la selección de materiales tomando en cuenta el diámetro del

fruto (Achal, *et. al.*, 1986), la colecta 12 es la de menor ancho y largo de fruto y placenta, la colecta 11 presenta la mayor longitud de fruto, este descriptor es una de las características que más influye en el rendimiento (Achal, *et. al.*, 1986). García (2006), reportó que los caracteres como peso, ancho y longitud del fruto son variables que contribuyen para discriminar la variabilidad encontrada entre y dentro de las especies de *Capsicum*.

La mayor longitud de placenta lo presenta la colecta 11, grosor del pericarpio la colecta uno presenta 5mm de grosor comparadas con las otras que solo presentan 4 mm en promedio, la colecta siete presenta mayor longitud de pedicelo, la colecta 11 presenta el menor tamaño de pedicelo y mayor grosor del pedicelo seguida de la colecta uno (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comparación de medias en nueve caracteres cuantitativos de fruto observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Colecta | Días a fructificación | Periodo de fructificación | Peso del fruto | Longitud fruto | Ancho de fruto | Longitud placenta | Longitud pedicelo | Grosor pedicelo* | Grosor pericarpio |
|---------|-----------------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| 1 | 162 | 69 | 56 | 53 | 56 | 25 | 4 | 3 | 5** |
| 2 | 160 | 62 | 51 | 52 | 56 | 23 | 4 | 2 | 4 |
| 3 | 161 | 39** | 66 | 50 | 60 | 23 | 4 | 2 | 4 |
| 4 | 155** | 63 | 48 | 52 | 53 | 23 | 4 | 2 | 4 |
| 5 | 162 | 51 | 52 | 56 | 53 | 23 | 4 | 2 | 4 |
| 6 | 160 | 65 | 54 | 53 | 58 | 24 | 4 | 2 | 4 |
| 7 | 158 | 46 | 57 | 58 | 56 | 24 | 5** | 2 | 4 |
| 8 | 157 | 64 | 44 | 45 | 53 | 22 | 4 | 2 | 4 |
| 9 | 161 | 50 | 56 | 55 | 59 | 22 | 4 | 2 | 4 |
| 10 | 164 | 68 | 64** | 54 | 61** | 23 | 4 | 2 | 4 |
| 11 | 162 | 68 | 35 | 58** | 43 | 27** | 3** | 3 | 4 |
| 12 | 163 | 69** | 30** | 43** | 43 | 20** | 4 | 2 | 4 |
| 13 | 162 | 48 | 48 | 55 | 52 | 23 | 4 | 2 | 4 |
| 14 | 159 | 55 | 56 | 52 | 53 | 24 | 4 | 2 | 4 |
| 15 | 166** | 46 | 54 | 55 | 53 | 23 | 4 | 2 | 4 |
| CV | 5.59 | 17.75 | 23.91 | 13.3 | 11.47 | 14.59 | 14.41 | 17.49 | 16.22 |
| p | 0.01 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.001 |

CV= coeficiente de variación, p= probabilidad Tukey <0.01, ** valores altamente significativos y * valores significativos.

Las colectas de chile manzano presentan forma cordada del fruto en unión con el pedicelo, no presentan cuello en la base del fruto, presentan ápice del fruto hundido, epidermis del fruto liso, mezcla varietal leve, el color del fruto en estado intermedio verde claro, posición de fruto pendiente, intensidad del color del fruto y brillantez

media, cavidad peduncular poco profunda, contenido de capsaicina en la placenta, posición de la placenta compacta, el pedicelo con el fruto es persistente y sabor del fruto pungente, es una característica de *C. pubescens*; estudios similares obtenidos por González (1985) (Cuadro 13).

El arrugamiento transversal del fruto es leve en las colectas cuatro, cinco, seis, once y doce a diferencia de las otras que el arrugamiento es intermedio, la persistencia del pedicelo con el tallo solo para la colecta 11 es intermedio, para el cuajado del fruto las colectas tres, cinco, siete y nueve fueron las que presentaron bajo cuajado de fruto, en número de lóculos las colectas dos, cinco, ocho, diez, once y doce las que presentan en promedio dos lóculos por fruto, siendo la colecta 11 la única que presenta 2 lóculos en todos sus frutos (Cuadro 13).

El color de fruto se midió basado en las tablas de colores (The royal horticultural society), las colectas uno, dos, ocho, nueve y trece entraron en el Red Group, con diferentes tonalidades, la colecta 7 está dentro del Orange group y todas las demás se ubicaron en el grupo Yellow-Orange con diferentes tonalidades (Cuadro 13, Figura 13).

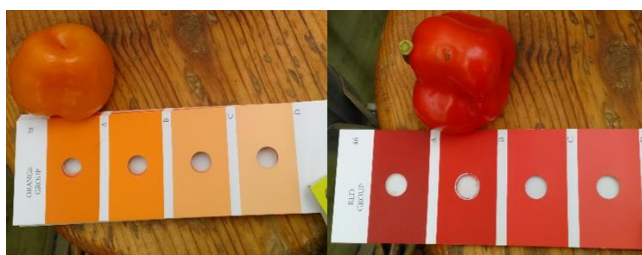


Figura 13. Medición de color en fruto utilizando tablas de colores

En la forma del fruto el 40% de las colectas presentan forma rectangular de acuerdo a los esquemas de la guía del SNICS, y el 60% presenta forma cuadrada, la relación ancho largo del fruto para las colectas cinco, once y trece es mediana y las otras presentan una relación pequeña, la forma predominante de la sección transversal para el 60% de las colectas es angular, la profundidad de la depresión interlocular se presenta en sus tres formas en las colectas solo para la colectas 11 y 12 es poco profunda en todos sus frutos (Cuadro 13, Figura 14).



Figura 14. Profundidad de la cavidad peduncular, A) poco profunda, B) mediana y C) profunda.

Cuadro 13. Moda en 25 caracteres cualitativos de fruto observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Descriptor/Colecta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | Descripción |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| forma del fruto en unión con el pedicelo | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | cordado |
| cuello en la base del fruto | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ausente |
| forma del ápice del fruto | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | hundido |
| apéndice del fruto vestigio de la floración | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ausente |
| arrugamiento transversal | 5 | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 3- leve y 5- intermedio |
| tipo de epidermis | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | lisa |
| condición de la mezcla varietal | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | leve |
| persistencia pedicelo con tallo | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 5- intermedia y 7-persistente |
| persistencia pedicelo con fruto | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | persistente |
| cuajado del fruto | 5 | 5 | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 5 | 7 | 7 | 5 | 5 | 5 | 3-bajo, 5-intermedio y 7-alto |
| color fruto estado intermedio | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | verde claro |
| número de lóculos | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | dos y tres |
| color de fruto | 45A | 45A | 21A | 23B | 23A | 23A | 25D | 46A | 44A | 23A | 17A | 21A | 42A | 21D | 23A | 45A, 46A Y 44A Rojos, 21A, 23A-B, 25D, 21D Y 17A amarillos y naranjas |
| forma del fruto* | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4- cuadrado y 5- rectangular |
| posición del fruto* | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | pendiente |
| relación ancho/largo de fruto* | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2- pequeña y 3- mediana |
| forma predominante de la sección transversal* | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1-elíptica y 2 angular |
| intensidad color fruto maduro* | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | medio |
| brillantez del fruto* | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | media |
| profundidad cavidad peduncular* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | poco profunda |
| cavidad peduncular* | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | presente |
| profundidad de la depresión interocular* | 5 | 7 | 7 | 3 | 3 | 5 | 7 | 5 | 7 | 5 | 3 | 3 | 3 | 7 | 5 | 3-poco profundas, 5- media y 7-profundas |
| sabor* | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | pungente |
| contenido de capsaicina en la placenta* | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | presente |
| posición de la placenta* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | compacta |

7.1.2.5 Semilla

Se evaluaron 6 caracteres en semilla de la guía IPGRI (1995), de los cuales cuatro son cuantitativos y 2 cualitativos. Para el carácter longitud de la semilla la colecta que presentó el mayor largo fue la siete y la de menor longitud la doce, en ancho de semilla la colecta con semillas más anchas fue la cuatro y el menor ancho lo obtuvo la colecta dos. El mayor número de semillas por fruto lo tuvo la colecta nueve con 77 semillas en promedio y el menor número de semillas la colecta ocho en este carácter no hubo diferencias significativas entre las colectas, para peso de 100 semillas la colecta uno presentó en promedio 2.45 g en peso fresco siendo esta la que mayor peso obtuvo (Cuadro 14).

Cuadro 14. Comparación de medias en cuatro caracteres cuantitativos de semilla observados en 15 colectas de Chile manzano del sur del Estado de México

| colecta | Longitud semilla | Ancho de semilla | Número semillas por fruto | Peso 100 semillas |
|---------|------------------|------------------|---------------------------|-------------------|
| 1 | 5.63 | 4.84 | 71.35 | 2.45* |
| 2 | 4.84 | 4.3** | 73.3 | 2.12 |
| 3 | 5.44 | 4.51 | 72.3 | 2.36 |
| 4 | 5.77 | 5.32** | 66.3 | 2.34 |
| 5 | 5.68 | 4.9 | 73.2 | 2.12 |
| 6 | 5.59 | 5.03 | 80.8 | 2.18 |
| 7 | 5.91** | 4.95 | 75.95 | 2.22 |
| 8 | 5.52 | 4.84 | 62.25 | 2.24 |
| 9 | 5.51 | 5.04 | 77.55 | 2.1 |
| 10 | 5.28 | 4.67 | 82.6 | 2.12 |
| 11 | 5.88 | 4.57 | 69.05 | 2.23 |
| 12 | 4.76** | 4.45 | 62.5 | 1.99* |
| 13 | 5.24 | 4.89 | 68.05 | 2.03 |
| 14 | 5.34 | 4.6 | 71.65 | 2.16 |
| 15 | 5.42 | 4.61 | 71.45 | 2.04 |
| CV | 10.9 | 10.35 | 28.19 | 14.43 |
| p | 0.0001 | 0.0001 | 0.04 | 0.0001 |

CV= coeficiente de variación, p= probabilidad Tukey <0.01, * valores significativos y ** valores altamente significativos.

En los caracteres cualitativos todas las colectas presentaron superficie de semillas áspera, el color de la semilla para las colectas uno, dos y doce fue café claro en

color de semilla fresco, la colecta doce es la única que conserva su color café claro aun estando la semilla en seco, las demás cambian su color a café oscuro, las otras colectas presentaron colores de semilla de café a café oscuro y muy oscuro (Cuadro 15, Figura 15).

Cuadro 15. Moda en dos caracteres cualitativos de semilla observados en 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México

| Descriptor/ Colecta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | Descripción |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|--|
| color de la semilla | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1-café claro, 2- café, 3-café oscuro y 4-café muy oscuro |
| superficie de la semilla | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | áspera |

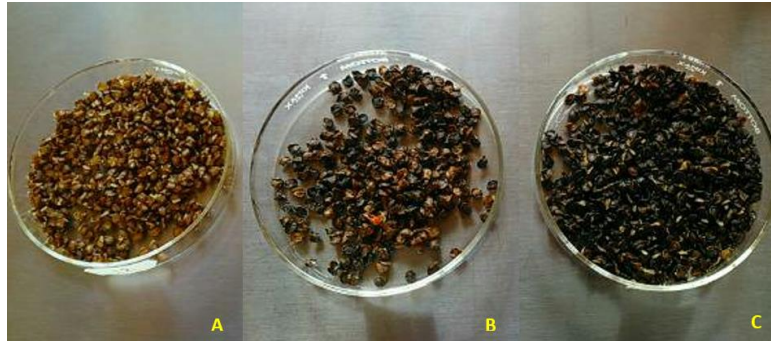


Figura 15. Color de semilla. A) Café claro, B) Café y C) Café oscuro

7.1.3 Resultados taxonomía numérica

Se encontraron 29 estados polimórficos de los 59 caracteres cualitativos evaluados en las colectas de chile manzano, equivalentes al 49%. Se contabilizaron 209 variantes morfoalélicas que en promedio constituyen cuatro morfoalélos por carácter. El número de morfoalélos en las tres colectas fue de 81, el cual constituyó el 40% del total registrado para el género *Capsicum* de acuerdo a las guías de caracterización de IPGR y del SNICS. La mayor proporción de morfoalélos por carácter correspondió al estado de planta con más del 50%, en tanto que el menor fue para fruto con el 34% (Cuadro 16).

Cuadro 16. Taxonomía numérica para caracteres de plántula, planta, flor y fruto en 15 colectas de chile manzano.

| Estructura | Guías <i>Capsicum</i> | | | <i>C. pubescens</i> evaluado | | |
|-----------------|-----------------------|-----|---------|------------------------------|-----|-------------|
| | DTR | MAT | MAT/DTR | P/NP | MAP | MAP/MAT (%) |
| Plántula | 4 | 18 | 5 | 4/0 | 8 | 44 |
| Planta | 16 | 50 | 3 | 10/6 | 32 | 64 |
| Flor | 12 | 45 | 3 | 4/8 | 17 | 38 |
| Fruto | 27 | 96 | 4 | 11/16 | 41 | 43 |
| Total | 59 | 209 | 15 | 29/30 | 98 | 47 |

CRS= Caracteres; **MAT=** morfoalelos totales; **P=** Polimórficos; **NP=** No polimórficos; **MAP:** Morfoalelos en colectas *C. Pubescens*.

Cuadro 17. Descriptores que presentan polimorfismo en las colectas de chile manzano.

| Variable | Moda | Estados descriptor | Estados encontrados | Variable | Moda | Estados descriptor | Estados encontrados |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--|-------------|--------------------|---------------------|
| 1 Color del hipocótilo | Morado | 3 | 2 | 16 color de las anteras | morado | 5 | 2 |
| 2 Pubescencia del hipocótilo | intermedia | 3 | 2 | 17 color filamento | morado | 6 | 2 |
| 3 Color hoja cotiledónea | Verde | 8 | 2 | 18 excercion del estigma | excerto | 3 | 3 |
| 4 Forma de hoja cotiledónea | Lanceolada | 4 | 2 | 19 arrugamiento transversal del fruto | intermedio | 3 | 2 |
| 5 color hoja | vede | 7 | 3 | 20 persistencia pedicelo con tallo | persistente | 3 | 2 |
| 6 antocianina del nudo | morado | 4 | 2 | 21 persistencia pedicelo con el fruto | persistente | 3 | 2 |
| 7 color tallo | verde con rayas purpura | 3 | 3 | 22 número de lóculos | tres | 3 | 2 |
| 8 pubescencia del tallo | intermedia | 2 | 3 | 23 cuajado del fruto | intermedio | 3 | 3 |
| 9 hábito de crecimiento | erecto | 3 | 2 | 24 color fruto estado maduro | naranja | 6 | 2 |
| 10 densidad de ramificación | intermedia | 3 | 3 | 25 forma del fruto | intermedio | 9 | 2 |
| 11 macollamiento | escaso | 3 | 2 | 26 relación ancho largo del fruto | pequeña | 5 | 2 |
| 12 densidad de hojas | intermedio | 3 | 2 | 27 forma predominante de la sección longitudinal | oval | 3 | 2 |
| 13 forma de la hoja | oval | 3 | 3 | 28 profundidad de depresión interocular | media | 5 | 3 |
| 14 pubescencia de la hoja | intermedia | 3 | 3 | 29 color de la semilla | café oscuro | 4 | 3 |
| 15 color de la corola | morado | 8 | 2 | | | | |

Se encontraron siete estados únicos en las colectas de chile manzano de los cuales cuatro (57%) se encontraron en la colecta 12 en flor y plántula, dos (29%) se encontraron en la colecta 11 en fruto y uno en la colecta ocho (14%) con macollamiento denso (Cuadro 18). Los estados únicos son de prioridad para la conservación debido a que estos pueden corresponder a atributos con valor

potencial (Pérez, *et. al.*, 2004), el color verde en el hipocótilo de la colecta 12 lo hace un carácter discriminante para poder identificar la colecta desde plántula ya que es la única que presentó color verde comparada con las demás que lo presentaron color morado.

Cuadro 18. Estados únicos encontrados en 15 colectas de chile manzano.

| Variable | Moda | Estados descriptor | Estados encontrados | Estados únicos | Accesión n |
|---------------------------------|-------------|--------------------|---------------------|----------------|------------|
| Color del hipocótilo | Morado | 3 | 2 | blanco | 12 |
| Macollamiento | escaso | 3 | 2 | denso | 8 |
| Color de la corola | morado | 8 | 2 | blanco | 12 |
| Color de las anteras | morado | 5 | 2 | amarillo | 12 |
| Color filamento | morado | 6 | 2 | blanco | 12 |
| Persistencia pedicelo con tallo | persistente | 3 | 2 | medio | 11 |
| Número de lóculos | tres | 3 | 2 | 2 | 11 |

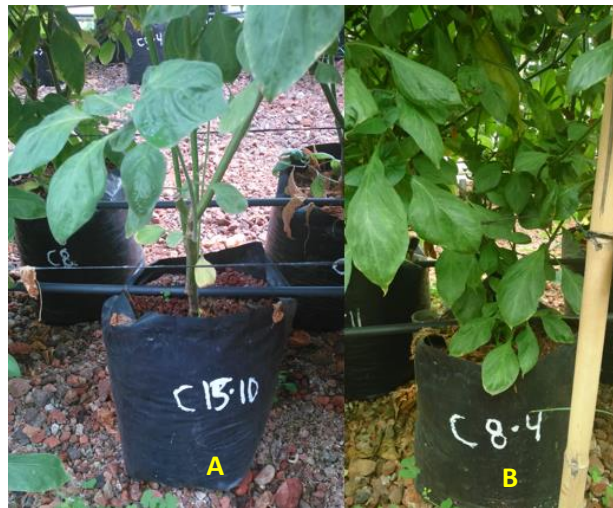


Figura 16. Densidad de Macollamiento, A) Macollamiento escaso colecta 15 y B) macollamiento denso colecta ocho.

7.1.4. Resultado análisis multivariado

Se realizó un análisis de agrupación con datos estandarizados, en 86 descriptores morfológicos en las 15 colectas de chile manzano, en la figura 17 se muestran cuatro grupos el primero formado por la colecta 11 en forma separada al igual que el segundo grupo con la colecta 12 con el color de corola blanca, color amarillo de anteras y filamento blanca como como altamente discriminantes en esta colecta, el tercer grupo formado por ocho colectas comerciales con frutos de color naranja y frutos de tamaño y peso mayores que la colecta 11, 12, el cuarto grupo formado por las cinco colectas con fruto de color rojo como carácter altamente discriminante.

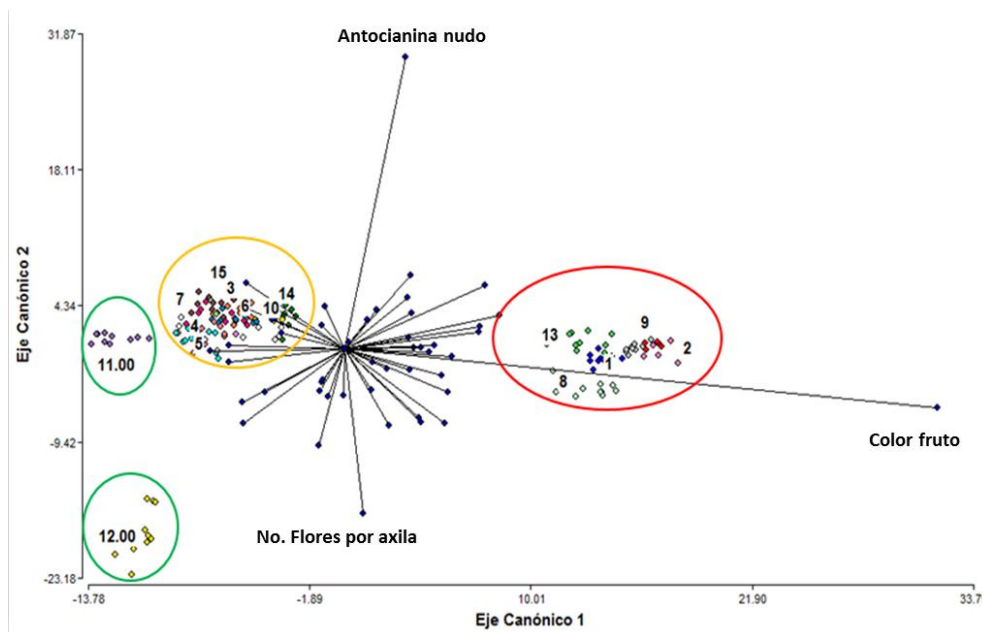


Figura 17. Análisis discriminante en 15 colectas de chile manzano. Verde= colectas contrastantes, Naranja= colectas comerciales y Rojo= colectas con fruto rojo.

El coeficiente cofenético (0.945) indicó un alto grado de correspondencia entre la matriz de similitud y el dendograma obtenido como medida de dispersión. Se obtuvo el análisis a 5 conglomerados, el primero está conformado por la colecta 12, el segundo colecta 11, el tercer conglomerado por cuatro 3 colectas comerciales de frutos naranjas y una de color de fruto rojo, el cuarto conglomerado está conformado por ocho colectas sin embargo la colecta 13, nueve y dos las separa estas tienen

fruto de color rojo y el quinto conglomerado está conformado por la colecta uno que es de fruto rojo (Figura 18).

En el dendograma de agrupamiento con corte arbitrario a 0.91 se conformaron dos grupos principales. En el primero, la colecta 12 se agrupó individualmente. El segundo grupo, se subdividió en dos, uno ellos solo incluyó a la colecta 11, la segunda colecta con más estados únicos. La separación de la colecta 12 y colecta 11, sugieren un mayor distanciamiento genético de estas con respecto al resto de las colectas y representan un reservorio de genes. El otro subgrupo incluyó al resto de las colectas que en sus dos extremos y al centro se posicionaron las colectas de fruto rojo. Los caracteres de separación entre las colectas de fruto rojo fueron el macollamiento denso para la colecta ocho y la forma alargada del fruto para las colectas uno, dos y nueve. La colecta 13 que se ubicó al centro del grupo presentó caracteres similares al resto de las colectas (Figura 18).

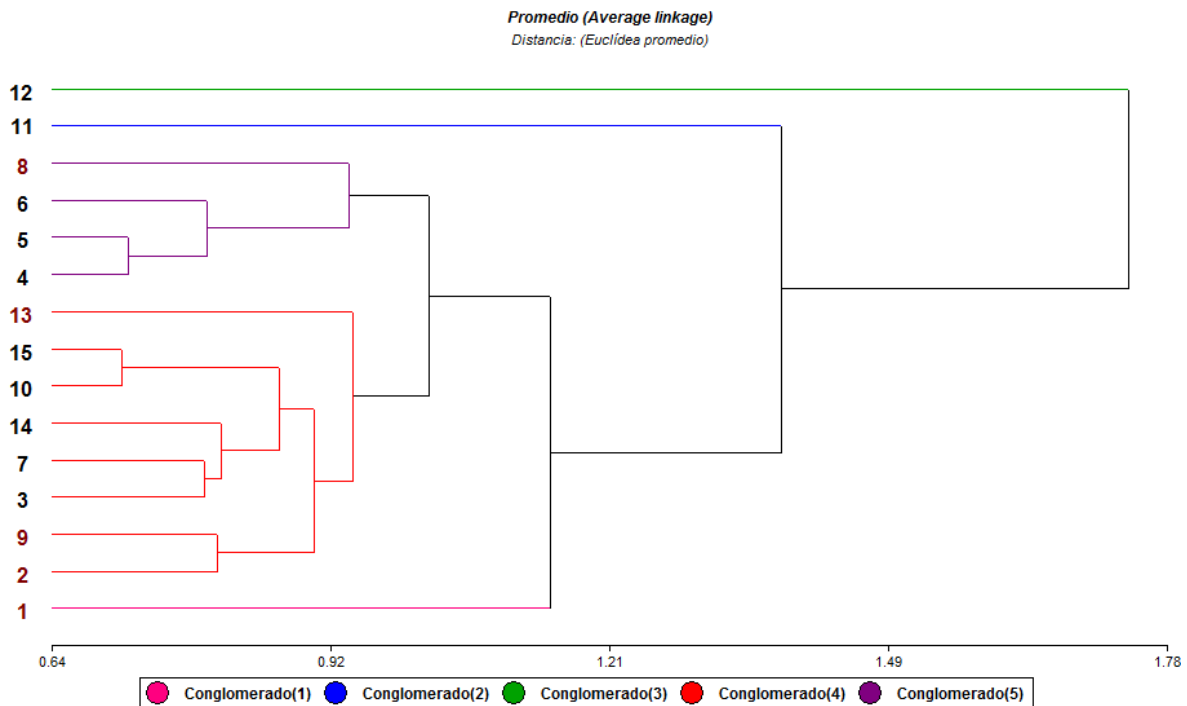


Figura 18. Dendograma, formación de cinco conglomerados con distancia euclídea promedio de 15 colectas de chile manzano del sur del Estado de México.

Las colectas 11 y 12 en la matriz de distancias euclídea al igual que en el dendograma mostraron un distanciamiento mayor con respecto a las demás colectas evaluadas (Figura 18, cuadro 19.).

Cuadro 19. Matriz de distancias euclídea promedio de 15 colectas de chile manzano

| colecta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| 1 | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 1.11 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 1.17 | 0.91 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 1.05 | 1.14 | 1.04 | 0 | | | | | | | | | | | |
| 5 | 1.05 | 1.13 | 1.07 | 0.72 | 0 | | | | | | | | | | |
| 6 | 1.09 | 0.96 | 0.89 | 0.8 | 0.79 | 0 | | | | | | | | | |
| 7 | 1.08 | 0.93 | 0.79 | 0.89 | 0.91 | 0.84 | 0 | | | | | | | | |
| 8 | 1.27 | 1.2 | 1.27 | 0.84 | 1.02 | 0.97 | 1.06 | 0 | | | | | | | |
| 9 | 1.17 | 0.81 | 0.91 | 1.05 | 1.01 | 0.94 | 0.83 | 1.1 | 0 | | | | | | |
| 10 | 1.13 | 0.88 | 0.88 | 0.94 | 1.04 | 0.89 | 0.91 | 1.2 | 0.9 | 0 | | | | | |
| 11 | 1.45 | 1.52 | 1.63 | 1.08 | 1.17 | 1.26 | 1.39 | 1.26 | 1.52 | 1.38 | 0 | | | | |
| 12 | 1.86 | 1.79 | 1.93 | 1.56 | 1.62 | 1.75 | 1.82 | 1.57 | 1.9 | 1.7 | 1.6 | 0 | | | |
| 13 | 1.28 | 0.95 | 1.04 | 0.93 | 0.93 | 0.97 | 0.98 | 1.11 | 0.91 | 1.01 | 1.44 | 1.75 | 0 | | |
| 14 | 1.21 | 0.98 | 0.8 | 1.08 | 1 | 0.94 | 0.82 | 1.23 | 0.98 | 0.92 | 1.54 | 1.83 | 0.94 | 0 | |
| 15 | 1.17 | 0.9 | 0.82 | 0.91 | 0.96 | 0.94 | 0.81 | 1.14 | 0.83 | 0.71 | 1.35 | 1.66 | 0.79 | 0.89 | 0 |

COMPONENTES PRINCIPALES

Se realizó un análisis de componentes principales, los primeros cuatro CP explicaron el 65% de la variabilidad acumulada (Cuadro 20), el CP1 las variables con mayor contribución en este componente son: longitud y diámetro del tallo, longitud y ancho de hoja, peso y ancho de fruto, longitud de pedicelo, grosor del pericarpio y número de semillas por fruto (Cuadro 21). En estudios realizados por Cerón y colaboradores (2012), reportan datos similares en el primer componente donde las variables que más aportaron fueron las relacionadas con fruto (peso, ancho y grosor del pericarpio) en estudios de caracterización morfológica en *Capsicum* spp, al igual que Hernández y colaboradores (1999) reportan que las variables de fruto son la que mayor variación aportan en los componentes principales.

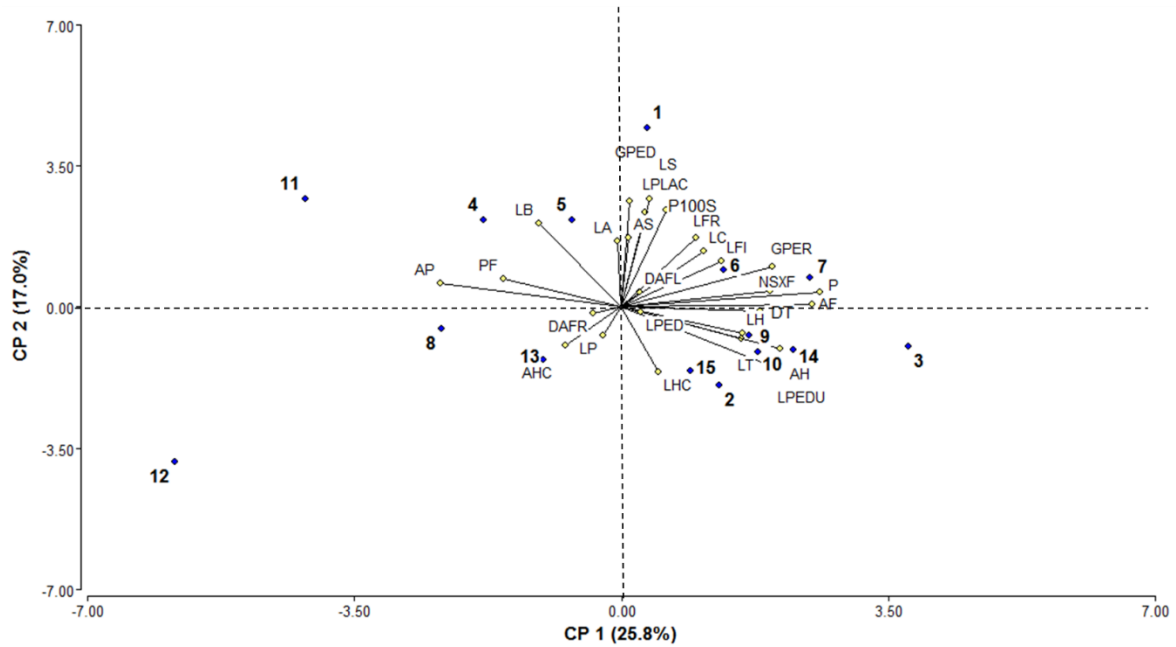


Figura 19. Primeros dos componentes principales con datos estandarizados de 27 caracteres cuantitativos en 15 colectas de chile manzano.

En el CP2 las variables con mayor contribución fueron; ancho de planta, longitud en brotes primarios, longitud de corola, periodo de fructificación, longitud de placenta, grosor del pericarpio, largo y ancho de semilla y peso de 100 semillas, para el carácter ancho de la planta, para el CP3 las variables con mayor contribución fueron longitud de la planta y de antera, Cerón y colaboradores (2012) mencionan datos similares en etas variables. Las variables que más aportaron en el CP4 fueron: ancho de hoja cotiledónea, longitud de pedicelo, días a fructificación y longitud de fruto (Cuadro 21). Estos datos permiten ver que la variabilidad está dada por características de fruto en primer lugar seguid de estructuras de planta y flor, resultados similares mencionados por Pardey, y colaboradores (2006).

Cuadro 20. Análisis de componentes principales (ACP) para 27 variables cuantitativas de las colectas de chile manzano.

| Número | Valor | Porcentaje | Porcentaje acumulado |
|--------|-------|------------|----------------------|
| 1 | 6.96 | 0.26 | 0.26 |
| 2 | 4.6 | 0.17 | 0.43 |
| 3 | 3.54 | 0.13 | 0.56 |
| 4 | 2.52 | 0.09 | 0.65 |

Cuadro 21. Contribución de las variables cuantitativas en los cuatro primeros componentes principales (CP) de las 15 colectas de chile manzano.

| Variables | CP 1 | CP 2 | CP 3 | CP 4 |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ancho de hoja cotiledónea | -0.27 | -0.28 | 0.29 | <u>0.38</u> |
| largo hoja cotiledónea | 0.18 | -0.48 | <u>0.35</u> | 0.14 |
| longitud del tallo | <u>0.57</u> | -0.23 | 0.18 | 0.25 |
| diámetro del tallo | <u>0.67</u> | -0.03 | 0.26 | -0.03 |
| longitud hoja | <u>0.58</u> | -0.19 | 0.29 | -0.27 |
| ancho hoja | <u>0.76</u> | -0.31 | -0.32 | -0.05 |
| longitud planta | -0.08 | -0.21 | <u>0.78</u> | 0.35 |
| ancho planta | -0.87 | <u>0.17</u> | 0.12 | 0.08 |
| longitud brote primario | -0.4 | <u>0.62</u> | 0.51 | 0.02 |
| longitud pedicelo | 0.09 | -0.04 | -0.4 | <u>0.4</u> |
| longitud corola | 0.39 | <u>0.41</u> | -0.35 | 0.09 |
| longitud anteras | -0.02 | 0.49 | <u>0.64</u> | 0.45 |
| longitud filamento | 0.48 | 0.34 | <u>0.52</u> | 0.05 |
| días a floración | 0.09 | 0.11 | <u>0.47</u> | -0.55 |
| periodo de fructificación | -0.57 | <u>0.2</u> | -0.42 | -0.28 |
| días a fructificación | -0.13 | -0.04 | -0.43 | <u>0.59</u> |
| peso del fruto | <u>0.95</u> | 0.11 | -0.06 | 0.01 |
| largo de fruto | 0.36 | 0.51 | -0.12 | <u>0.67</u> |
| ancho de fruto | <u>0.91</u> | 0.02 | -0.06 | -0.17 |
| longitud placenta | 0.11 | <u>0.70</u> | -0.12 | 0.31 |
| longitud pedúnculo | <u>0.72</u> | -0.44 | 0.28 | 0.08 |
| grosor pericarpio | <u>0.73</u> | 0.3 | -0.04 | -0.2 |
| grosor pedúnculo | 0.04 | <u>0.78</u> | -0.42 | -0.02 |
| longitud de la semilla | 0.14 | <u>0.80</u> | 0.24 | 0.01 |
| ancho de la semilla | 0.04 | <u>0.51</u> | 0.39 | 0.01 |
| número de semillas por fruto | <u>0.71</u> | 0.11 | -0.33 | 0.27 |
| peso 100 semillas | 0.22 | <u>0.71</u> | -0.01 | -0.55 |

Correlación cofenética= 0.949, variables subrayadas aportan mayor contribución a cada componente.

Algunas de las correlaciones más altas se presentaron entre las variables que componen al CP1: longitud de pedúnculo con longitud de tallo, peso de fruto con diámetro de tallo, ancho de hoja con peso fruto, ancho de fruto, longitud pedicelo y número de semillas por fruto, para la variable peso de fruto correlaciona positivamente con ancho de fruto, grosor pericarpio y número de semillas por fruto (Cuadro 22).

Cuadro 22. Matriz de coeficientes de correlación entre nueve variables cuantitativas pertenecientes al CP1 de 15 colectas de chile manzano.

| Variables | Longitud de tallo | Diámetro tallo | Longitud hoja | Ancho hoja | Peso de fruto | Ancho fruto | Longitud pedúnculo | Grosor Pericarpio | Núm. Semillas/ fruto |
|----------------------|-------------------|----------------|---------------|-------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Longitud de tallo | 1 | | | | | | | | |
| Diámetro tallo | 0.3 | 1 | | | | | | | |
| Longitud hoja | 0.2 | <u>0.66</u> | 1 | | | | | | |
| Ancho hoja | 0.47 | 0.49 | 0.51 | 1 | | | | | |
| Longitud corola | 0.26 | -0.01 | -0.06 | 0.11 | | | | | |
| Peso de fruto | 0.49 | <u>0.68</u> | 0.45 | <u>0.66</u> | 1 | | | | |
| Ancho fruto | 0.37 | <u>0.68</u> | 0.48 | <u>0.67</u> | <u>0.95</u> | 1 | | | |
| Longitud pedúnculo | <u>0.69</u> | 0.37 | 0.42 | <u>0.63</u> | <u>0.63</u> | 0.6 | 1 | | |
| Grosor Pericarpio | 0.28 | 0.49 | 0.44 | 0.28 | <u>0.75</u> | 0.7 | 0.28 | 1 | |
| Núm. Semillas/ fruto | 0.21 | 0.41 | 0.28 | <u>0.59</u> | <u>0.74</u> | 0.7 | 0.42 | 0.41 | 1 |

Valores subrayados son significativos ($P < 0.001$)

Las correlaciones que se presentaron en las variables del CP” fueron: periodo de fructificación con ancho de la planta, grosor del pedúnculo con longitud de corola y periodo de fructificación, peso de 100 semillas con grosor del pedúnculo y longitud de la semilla, longitud de placenta con longitud de placenta, grosor pedúnculo, longitud de semilla y peso de 100 semillas (Cuadro 23).

Cuadro 23. Matriz de coeficientes de correlación entre nueve variables cuantitativas pertenecientes al CP2 de 15 colectas de chile manzano.

| Variables | Ancho de planta | Longitud brote primario | Longitud de corola | Periodo de fructificación | Longitud de placenta | Grosor pedúnculo | Longitud de semilla | Ancho de semilla | Peso 100 semillas |
|---------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------|------------------|---------------------|------------------|-------------------|
| Ancho de planta | 1 | | | | | | | | |
| Longitud brote primario | 0.5 | 1 | | | | | | | |
| Longitud corola | -0.51 | 0.1 | 1 | | | | | | |
| Periodo de fructificación | <u>0.59</u> | 0.17 | -0.02 | 1 | | | | | |
| Longitud de placenta | 0.12 | 0.22 | 0.28 | 0.09 | 1 | | | | |
| Grosor pedúnculo | 0.06 | 0.24 | <u>0.53</u> | <u>0.53</u> | <u>0.66</u> | 1 | | | |
| Longitud de semilla | 0.09 | 0.43 | -0.16 | -0.16 | <u>0.62</u> | 0.36 | 1 | | |
| Ancho de semilla | 0.13 | 0.43 | -0.16 | -0.06 | 0.01 | 0.2 | <u>0.64</u> | 1 | |
| Peso 100 semillas | -0.11 | 0.39 | 0.4 | 0.1 | <u>0.57</u> | <u>0.57</u> | <u>0.56</u> | 0.28 | 1 |

Valores subrayados son significativos ($P < 0.001$)

La variable que muestra alta correlación en la matriz para el CP3 fue longitud de filamento con longitud de antera (Cuadro 24). La matriz de correlación para el CP4 no mostro ninguna correlación significativa entre las variables ancho hoja cotiledónea, longitud pedicelo, días a fructificación y largo de fruto (Cuadro 25).

Cuadro 24. Matriz de coeficientes de correlación entre cinco variables cuantitativas pertenecientes al CP3 de 15 colectas de chile manzano.

| Variables | Longitud hoja cotiledónea | Longitud planta | Longitud de anteras | Longitud de filamento | Días a floración |
|---------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Longitud hoja cotiledónea | 1 | | | | |
| Longitud planta | 0.34 | 1 | | | |
| Longitud de anteras | 0.21 | 0.46 | 1 | | |
| Longitud de filamento | 0.05 | 0.41 | <u>0.54</u> | 1 | |
| Días a floración | 0.3 | 0.05 | 0.3 | 0.24 | 1 |

Cuadro 25. Matriz de coeficientes de correlación entre cinco variables cuantitativas pertenecientes al CP4 de 15 colectas de chile manzano.

| Variables | Ancho hoja cotiledónea | Longitud pedicelo | Días a fructificación | Largo de fruto |
|------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|----------------|
| Ancho hoja cotiledónea | 1 | | | |
| Longitud pedicelo | 0.04 | 1 | | |
| Días a fructificación | 0.11 | 0.03 | 1 | |
| Largo de fruto | -0.04 | 0.29 | 0.25 | 1 |

Valores subrayados son significativos ($P < 0.001$)

7.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

7.2.3 Evaluación de la cantidad y calidad de ADN

Medición con Nanodrop

Los valores de espectrofotometría UV/Visible 260/280 promedio de 1.6 nos permite confirmar una cantidad suficiente de ADN, el valor más alto fue de 2.14 y supero al más bajo de 0.66 con casi 4 veces. Los índices menores a 1.8 podrían indicar contaminación por proteínas. De igual manera, los valores promedio de espectrofotometría UV/Visible 260/230 fue de 0.5, ninguna de las muestras supero los 2.0 lo cual indica que puede haber contaminación por carbohidratos y fenoles medidos en estas longitudes de onda (Alejos *et. al.*, s. a.) y que pudieran interferir en los ensayos de PCR de punto final, cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR), análisis de Polimorfismos de nucleótido único (SNPS) o la secuenciación automática

de muestras de ADN en plásmidos, cósmidos u otros vectores (Cuadro 26), sin embargo el segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas.

Cuadro 26. Resultados de la evaluación de calidad y cantidad de ADN en 15 colectas de chile manzano.

| Colecta | abs. | 260/280 | 260/230 | ng/ul |
|-----------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1 | 3.312 | 2.03 | 0.48 | 79 |
| 2 | 1.034 | 2.05 | 0.79 | 40.8 |
| 3 | 0.606 | 0.55 | 0.1 | 2.9 |
| 4 | 0.77 | 1.89 | 0.77 | 29.5 |
| 5 | 2.094 | 1.99 | 0.48 | 50 |
| 6 | 0.818 | 2.14 | 1.2 | 49.1 |
| 7 | 0.702 | 2.03 | 0.38 | 13.4 |
| 8 | 2.704 | 1.98 | 1.24 | 167.2 |
| 9 | 1.262 | 2.02 | 1.04 | 65.9 |
| 10 | 1.245 | 2 | 0.21 | 12.9 |
| 11 | 0.633 | 1.38 | 0.16 | 4.9 |
| 12 | 0.743 | 1.75 | 0.35 | 12.9 |
| 13 | 0.435 | 0.76 | 0.06 | 1.3 |
| 14 | 0.523 | 0.66 | 0.1 | 2.1 |
| 15 | 0.56 | 0.84 | 0.05 | 1.3 |
| Promedio | 1.2 | 1.6 | 0.5 | 35.5 |

Espectrofotometría

La extracción del ADN en la colectas de chile manzano no fue complicada ya que no presento dificultades en las precipitaciones durante el proceso de extracción, ni problemas de viscosidad en el filtrado de las muestras lo cual podría ser que no presenta altos contenidos de metabolitos secundarios, en la Figura 20 se muestra el ADN obtenido de las 15 colectas de chile manzano en el gel de agarosa, la colecta 13 muestra un ligero barrido, sin embargo la medición de ADN en nanodrop mostro que si se obtuvo ADN en baja cantidad.

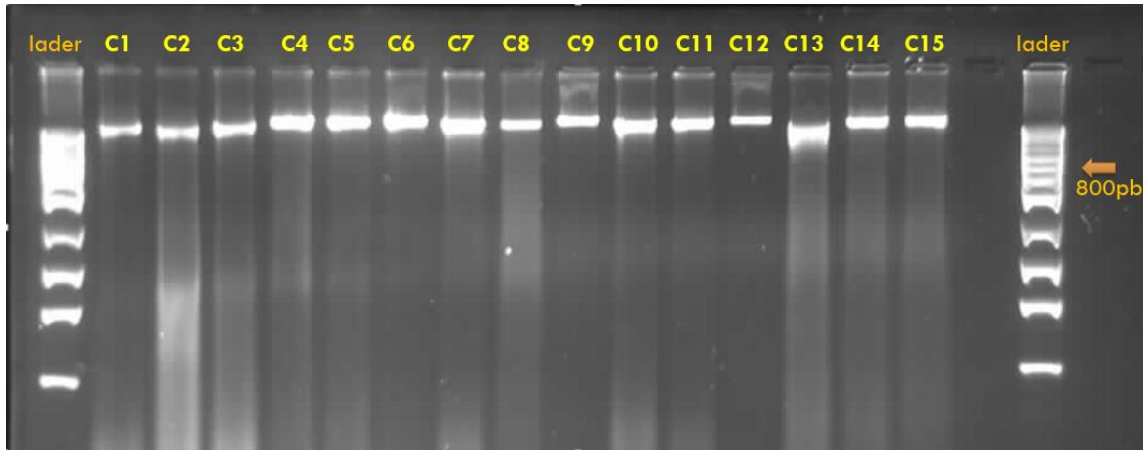


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con las muestras del ADN extraído en 15 colectas de chile manzano, observado en fotodocumentador de geles.

7.3 ARTÍCULO

Phenotypic variation among populations of *Capsicum pubescens* in southern Mexico State

Imelda Martínez-Estrada, Jaime Mejía-Carranza*, Juan C. Reyes-Alemán and Luis M. Vázquez-García

Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 1.5 Carretera Tenancingo –Villa Guerrero, Tenancingo, Estado de México. CP 52400. *Corresponding author (jmejia@uaemex.mx)

ABSTRACT

The identification of genetic variability and distinctive phenotypic characteristics in plants is a prerequisite for initiating a genetic breeding program. The objective of this study was to characterize the morphology of 15 populations of *Capsicum pubescens*. The collections of C1 to C15 obtained from production areas and local markets of the region were characterized using 86 descriptors for *Capsicum* from the IPGRI and SNICS guides, and analyzed by numerical taxonomy and multivariate analysis. Of 59 qualitative characters analyzed, 50% showed variation in degree, which could be affected by additive genes, while the other 50% showed binary states or more variation that may be regulated by major genes. Seven unique states were found in three collections, among which dense branching, bilocular fruit, and white corolla stand out. In the discriminant analysis and phenogram with non-significant classification error probabilities ($P > 0.05$), the C11 and C12 collections, of rustic appearance, constituted distinct groups; the C1, C2, C8, C9, and C13 collections with red pericarp were grouped as another group; the remaining collections C3, C4, C5, C6, C7, C10, C14, and C15, constituted the group with highest commercial acceptance. Principal components 1, 2, and 3 explained 56% of the total variation and were associated mainly with plant size, fruiting period, and size and weight of fruit. The observed phenotypic variation would allow the selection of outstanding populations and combination of morphological characters through directed hybridization.

Keywords: intraspecific variability, morphological characterization, multivariate analysis, numerical taxonomy,

INTRODUCTION

The center of origin of the genus *Capsicum* spp. is South America, with the number of species varying from 20 to 30 depending on the author (Pickershill, 1971; Loaiza-Figueroa et al., 1989; Moscone et al., 1993), among which *C. annuum*, *C. Chinensis*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, and *C. Pubescens* are the most cultivated species around the world. In Mexico there is a varying number of cultivated and wild chili types, principally of the species *C. annuum*, *C. Chinensis*, *C. frutescens* y *C. pubescens*, which include wide genetic diversity and distribution that for many remain undescribed. The characterization of these materials would allow the recording of agronomic, morphological, and physiological descriptors for the identification of genetic variability and groupings, which together constitute essential factors for the selection and combination of their characters for genetic improvement of different attributes (Pickershill, 1997; Medina et al., 2006). In this sense, investigations of characterization at different levels have generated information on the intraspecific and interspecific variation of the *Capsicum* genus (Palacios and García 2008; Medina et al, 2006; Castañón-Nájera, et al., 2008; Moreno *et. al.*, 2011; Villota-Cerón et al., 2012; Ibarra-Torres, 2015). Discriminant descriptors in the characterization of the *Capsicum* genus are mainly found in plant architecture, flower and fruit (Medina et al, 2006). Other studies have reported plant height, leaf shape, flower structure, fruiting days and number of fruits per plant, fruit shape at the junction with the pedicel, and fruit width, length, and shape (Castañón-Nájera et al., 2008; Moreno *et. al.*, 2011). Nevertheless, according to Bran et al. (2012), highly discriminating factors are the anther length, seed weight, and pedicel and placenta length. Morphological characterization also involves factors of vertical and horizontal resistance to phytosanitary and environmental problems, among others. In particular, the species *Capsicum pubescens* Ruiz and Pavón, originating from temperate and cold areas of South America (Pickershill, 1997), is cultivated in central Mexico at altitudes between 1600 and 2400 masl (Pérez and Castro, 1998). This specie's fruits have a fleshy pericarp and is generally consumed fresh, quality that have converted it into an export product in the last decade. For this reason, its cultivation in the southern region of Mexico State has become important, and production methods have shifted from rustic cultivation within fruit orchards to intensive greenhouse monoculture. Notwithstanding, agriculture of this species is confronted with problems of heterogeneity in the shape and quality of the fruits, which has resulted in decreased profit for producers. In addition, phytosanitary problems such as susceptibility to pests and diseases including

wilt caused by *Fusarium oxisporum* and *Phytophthora capsici* (Pérez and Castro, 1998) also decrease yields. The diverse number of morphological variants in this species, known in Mexico as “chile manzano” or manzano pepper, are mainly the result of selection by producers and are evidence of still-uncharacterized genetic variability, a condition that would facilitate conservation and selection of promising materials for genetic improvement. As such, harnessing intraspecific variability through genetic breeding programs could contribute to the development of new materials with different attributes. The objective of this study was to identify, using morphological characterization, the phenotypic variability of 15 collections of manzano pepper cultivated in different ecological niches in the southern region of Mexico State, as a first step toward utilizing this variability in genetic conservation and breeding programs.

MATERIALS AND METHODS

Vegetable material was collected in an area of the southern region of Mexico State between 18° 21' and 19° 34' N and 99° 16' and 100°36' W with an altitudinal range of 1600 to 2400 masl. The climate ranges from warm to warm subhumid with an annual precipitation of 900mm and temperature between 14.7° C and 26° C (Secretaría del Medio Ambiente, 2010). Collections were from 15 populations of *C. pubescens*, three of which (C3 C11, C12) had visible morphological contrasts among them in plant, flower, and fruits collected in production areas. The other 12 with the criteria of contrast in fruit color and shape were obtained from small producers in local markets in Tenancingo (C1, C2, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C13, C14, and C15). The experiment was carried out at the Centro Universitario Tenancingo of the Universidad Autónoma del Estado de México from February 2014 to December 2015. Seeds were extracted from recently harvested, physiologically mature fruits of good physical appearance and without visible sanitary problems. They were sown in 72-well polystyrene germination trays in a substrate composed of a 3:1 ratio of peat moss to zeolite, with one seed per well at a depth of 0.5 cm. Seedlings were transplanted when they had eight true leaves to 45L-capacity black plastic bags with a substrate of tezontle (volcanic rock; 90%) and worm castings (10%). Ten plants were established from each collection in a completely random array in double lines with 1m separation between plants. The environmental conditions in the greenhouse were of 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity, 75% relative humidity, and 24 °C average temperature. Plants were watered and fertilized according to the solution proposed by Steiner (1984) using drip-watering. Characterization was done using 86 morphological descriptors of the seedling, plant, flower, and fruit, 68 of which were from the guide “Descriptores para *Capsicum* spp”, by the IPGRI (1995), and 18 complementary descriptors from the “Guía para la descripción varietal de *C. annum*”, by the SNICS

(2014). Flower characters were measured on flowers immediately upon anthesis, and flowering days were from sowing until the plants presented at least one open flower. Fruits were evaluated at physiological maturity, except for the character of color of immature fruits. Data for seeds were taken from fresh recently extracted seeds. The variables were analyzed using numerical taxonomy according to qualitative (binary, disordered multistate, and ordered multistate) and quantitative (continuous and discontinuous) descriptors (Crisci y López, 1983). The matrices of the data of the quantified variables were analyzed using multivariate analyses in the statistical software InfoStat (Di Rienzo et al., 2015). In order to group the variability of the collections in the study, in the discriminant and cluster analyses, the data of the 86 multivariate descriptors were standardized by hierarchical conglomerate using the linking UPGMA method and average euclidean distances from the unweighted arithmetic mean. In the principal components analysis, quantitative data were standardized to allow them to be analyzed according to their correlations.

RESULTS AND DISCUSSION

The vegetative structure with the greatest number of descriptors present was the fruit, with 40 types, which together with the flower represented 65% of the total characters evaluated (Table 1). The characters of these structures have also been reported as highly discriminant in the characterization of *C. annuum* var *glabriusculum* (Bran et al., 2012). The remaining 35% was for states of the seedling and plant, with the lowest number corresponding to the plant. Of the 86 morphological descriptors, 59 were qualitative and 27 quantitative. Of the 59 qualitative descriptors, 31 were categorized as ordered multistate characters, suggesting greater variation in degree of a single type than in different types grouped in unordered multistate characters. As such, the observed ordered multistate variation could be due to polygenic effects in the phenotypic expression of the character, which would be quantitative in nature and considerably affected by the environment (Orr, 2001). Disordered multistate characters accounted for 30% of the 59 qualitative descriptors, such that less than one fifth of the characters were binary. These last two states, due to their discrete category conditions, could be more closely related to major genes, which are responsible for their expression.

Table 1. Numerical taxonomy for descriptors of seedlings, plants, flowers, and fruits of the 15 collections of *C. pubescens*.

| Vegetative structure | Descriptors | | | | | Total |
|----------------------|-------------|----|----|--------------|----|-------|
| | Cualitative | | | Cuantitative | | |
| | Bin | OM | DM | CN | DN | |
| Seedling | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 | 6 |
| Plant | 2 | 7 | 7 | 8 | 0 | 24 |
| Flower | 3 | 1 | 8 | 3 | 1 | 16 |
| Fruit | 5 | 9 | 13 | 11 | 2 | 40 |
| Total | 10 | 18 | 31 | 24 | 3 | 86 |

Bin=binary; OM=ordered multistate; DM=disordered multistate; CN=continuous numeric; DN=discontinuous numeric

The 59 qualitative descriptors analyzed comprise 209 morpho-allelic variants in accordance with the IPGR and SNICS characterization guides used in this study (Table 2). In the 15 *C. pubescens* collections, 29 qualitative descriptors (49% of the 59 total) were polymorphic, and these included 98 morphoalleles (44% of the 209 mentioned by the guides Table 2). The highest proportion of morphoalleles per character occurred in the plant state, which suggests the greatest phenotypic variation for descriptors of this vegetative structure, while the lowest was for flowers, with 38%. Nearly 50% of the reported variation in descriptors and polymorphisms was represented in the 15 collections. This is considerable for a single species, given the 90% of total reported variation in Medina et al.'s (2006) much broader study including variants of five different species of *Capsicum*. The three collections of *C. pubescens* from South America included in Medina et al.'s (2006) study did not reach the levels of variation reported here. The rugged topography of the region where the materials evaluated were grown include a wide variety of ecological niches (Secretaría del Medio Ambiente, 2010), which, in conjunction with the management of the species by local communities (Altieri, 1987) may contribute to the variability of *C. pubescens*. The combination of morphoalleles of such variability in breeding programs would allow a considerable range of combinations of desirable morphological characters and selection of stock for hybridization programs.

Table 2. Morphoallelic analysis of qualitative descriptors of *Capsicum pubescens*.

| Getative structure | <i>Capsicum</i> Guides | | | | <i>C. pubescens</i> | CPM/TM (%) |
|--------------------|------------------------|-----|--------|-------|---------------------|------------|
| | DTR | TM | TM/DTR | P/NP | PM | |
| Seedling | 4 | 18 | 5 | 4/0 | 8 | 44 |
| Plant | 16 | 50 | 3 | 10/6 | 32 | 64 |
| Flower | 12 | 45 | 3 | 4/8 | 17 | 38 |
| Fruit | 27 | 96 | 4 | 11/16 | 41 | 43 |
| Total | 59 | 209 | 15 | 29/30 | 98 | 47 |

DTR= Descriptor; TM= total morphoalleles; P= Polimorphic; NP= Non-polymorphic; CPM= *C. Pubescens* morphoalleles

Unique morphoallelic states were observed for seven descriptors, of which three corresponded to the flower and two to the fruit, constituting 62% of the observed (Table 3). Seedlings and plants only showed unique states for the descriptors of white coloration of the hypocotyl in C12 and dense branching in C8, respectively. Medina et al. (2006) also reported white hypocotyl color as a unique state, but only in *C. annum*. In the flower structure, unlike *C. annum* whose specimens exhibited white corolla, the evaluated collections of *C. pubescens* all had purple corolla except for C12, which had white corolla. This same collection also exhibited yellow anthers and white filaments, morphoalleles that are different from the other collections (Table 3). In addition, C12 was the only collection to present two flowers per axil, 30% of the time, unlike the other collections that had one or occasionally two, a character, which for this collection in particular was heteromorphic. This character is one of the most important variables for differentiating morphotypes, where the solitary flower condition is of simple inheritance, controlled by the FASCICULATA gene (Andrews, 1995). The corresponding recessive condition (fa) expresses determinate growth of multiple flowers per axil (Elitzur et al., 2009). The same gene in the dominant condition also codes for the sympodial branching condition of non-apical dominance, contrary to the recessive, which codes for determinate growth. The presence of one flower per axil in the studied collection suggests the presence of the dominant form of the FASCICULATA gene; however, the presence of two flowers per axil in one third of the plant in the C12 collection suggests the presence of an allelic variant of the gene or some pleiotropic effect on it. The unique state of dense branching in the C8 collection could be a character of agronomic interest, since the number of main branches is positively correlated with yield (Solanki et al., 1986). Another study with a larger number of species and intraspecific variants of the *Capsicum* genus, which

included *C. pubescens* from eight collections from three regions of South America (Medina et al. 2006), did not report variations in branching with the presence of the “scarce” variant. The increase in number of stems suggests an increase in the number of flowers and fruits; as such, the use of this collection could be useful for increasing fruit number, which is reported to be highly heritable in *C. chinense* (Manju y Sreelathakumary, 2002), though this does not necessarily correlate with yield. The collection with the highest number of unique states was C12 with four of the seven states, followed by C11 with two and C8 with just one. The presence of unique morphoallelic states in C12, C11, and C8 suggests greater separation of these from the other collections evaluated and confers conservation priority due to their genetic variability, which could be utilized for commercial or basic reserach applications by functioning, among other things, as a genetic marker of other closely linked attributes (Van Hintum, 1995). In the same way, the collections with unique states are ideal for use as stock in the development of recombinant inbred lines (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000) and subsequent studies for the construction of genetic linkage maps (Lefebvre, et al., 1995).

Table 3. Unique morphological states of the 15 *Capsicum pubescens* collections.

| Descriptor | State of the Descriptor | | | | Collection |
|-------------------|-------------------------|-------|-------------|--------------|------------|
| | Recorded | Found | Modal State | Unique State | |
| Hypocotyl color | 3 | 2 | Purple | White | C12 |
| Branching | 3 | 2 | Scarce | Dense | C8 |
| Corolla color | 8 | 2 | Purple | White | C12 |
| Anther color | 5 | 2 | Purple | Yellow | C12 |
| Filament color | 6 | 2 | Purple | White | C12 |
| PPS | 3 | 2 | Persistent | Medium | C11 |
| Number of locules | 3 | 2 | 3 | 2 | C11 |

PPS= Persistence of the pedicel with stem

The spatial separation among groups based on multivariate qualitative and quantitative values by discriminant analysis (Figure 1) denotes a contrast between collection groups with non-significant probabilities of classification error ($P>0.05$). These results suggest considerable morphological variability in the collections evaluated considering that *C. pubescens* is a species that was introduced from the Andean region of Peru and Bolivia (Pickersgill, 1971; McLeod et al., 1982). Besides, the number of collections analyzed here was small compared to other studies, which have included more than 100 populations of different species (Medina et al., 2006). In this respect, it is important to note the presence of additional morphological variants not considered in this study. Collections C11 and

C12, which had the contrasting attributes of two locules per fruit and white corolla color respectively, in addition to possessing these unique states, were separated from the other populations at the negative extreme of the canonical axis 1. On the contrary, C1, C2, C8, C9, and C13- populations that all had red pericarp color- were grouped at the opposite extreme. The remaining collections- C3, C4, C5, C6, C7, C10, C14, and C15- whose fruit phenotypes were most commercially accepted, were the most numerous group, and C3 stands out as the most cultivated collection in the region. These collections, which constituted the most numerous group, were positively correlated with pericarp thickness, seed size, leaf size, and fruit size (Martín y González, 1991), criteria of agronomic importance that are mentioned in the processes of anthropogenic selection (Votava, 2005). The fruit size character is also considered one of the most influential characters affecting yield and is described as a highly heritable and discriminant element of intraspecific variability (Martín and González, 1991).

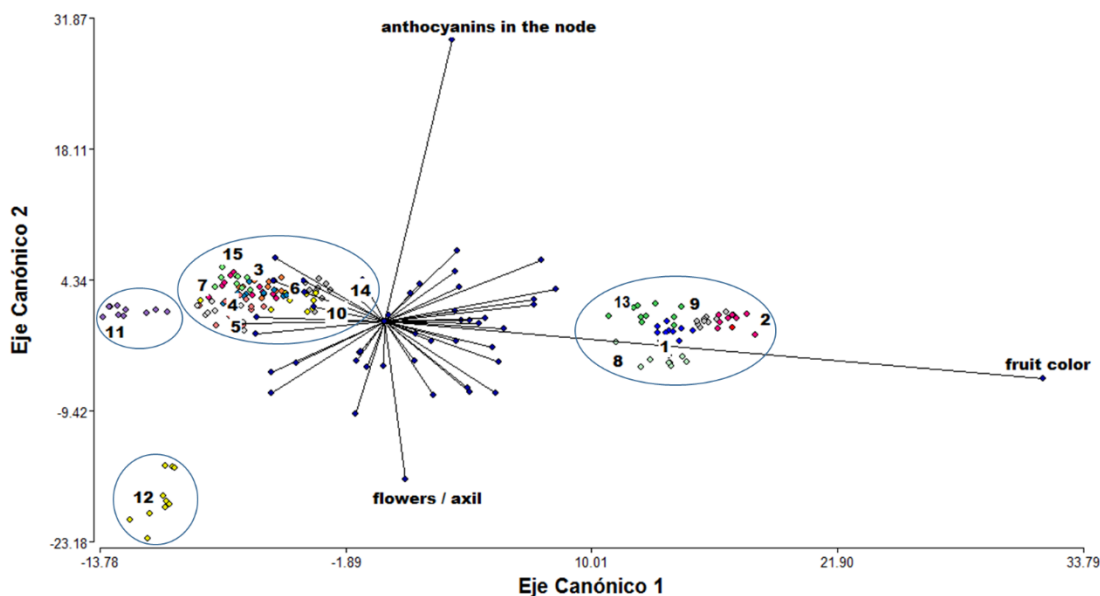


Figure 1. Discriminant analysis of 86 variables for the differentiation of 15 manzano pepper collections.

In the group phenogram with an arbitrary cutoff point of 0.91, two main groups were determined (Figure 2). The first is C12 alone. The second group is subdivided in two; one included only C11, the collection with the second-highest number of unique states. The separation of C12 and C11 suggests greater genetic distance between these and the rest of the collections and represents a genetic reservoir. The other subgroup included the rest of the collections, which at its two extremes and in the center included the collections with red fruits. The characters of separation within the collections with red fruits were the dense branching of C8 and elongated fruit shape of C1, C2, and C9. The C3

collection was located at the center of the group and presented characters similar to the rest of the collections.

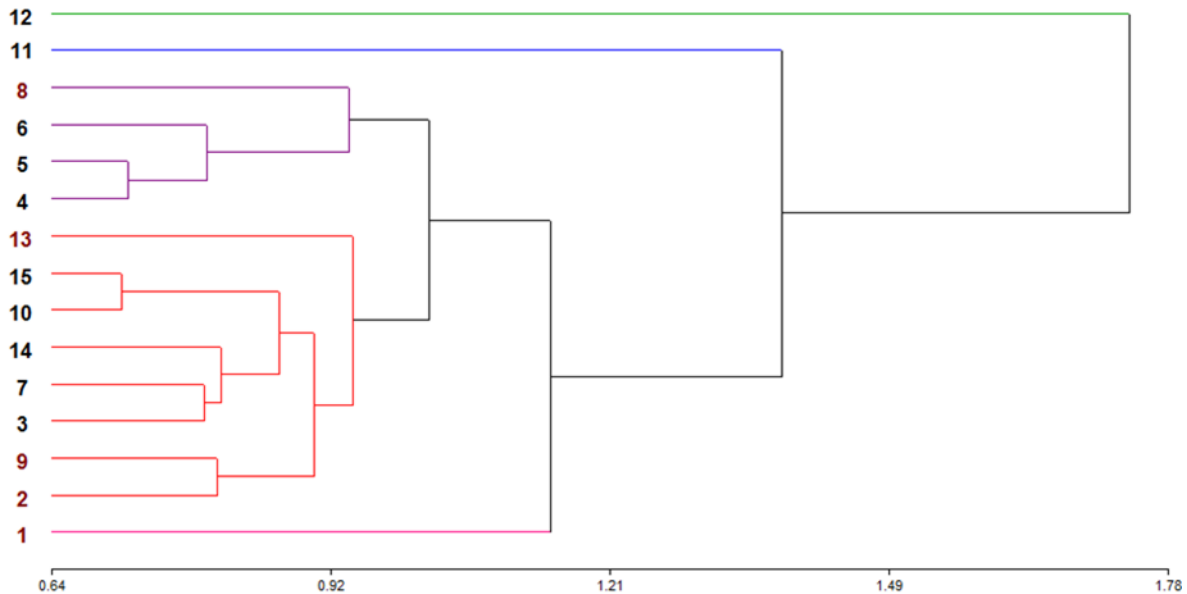


Figure 2. Group phenogram by UPGMA method of cluster analysis of 15 manzano pepper collections based on 86 morphometric descriptors of seedlings, plants, flowers, and fruits.

The separation of collections in the phenogram suggests a high degree of conservation of populations that due to the rugged topography of the region are cultivated in different ecological niches and provide a relatively isolated condition, such that the gene flow among populations is low, a condition reported by Pickersgill (1997). For their part, Moscone and collaborators (1993) in karyotype studies in *Capsicum*, particularly in *C. pubescens*, found few cases of homologous heteromorphic chromosomes, a condition associated with a relatively low degree of structural heterozygosity due to hybridization among populations. Furthermore, studies of isoenzymes revealed general autocompatibility in the genus, where cultivars are predominantly self-fertile (Jensen et al., 1979; Loaiza-Figueroa et al., 1989). In addition, the *C. pubescens* collections evaluated presented floral stigma in heteromorphic condition, with slightly exserted (42%), same length (42%), and slightly inserted (16%) states. This suggests high percentages of autogamy and geitonogamy due to the compaction of the population, which makes seed saving by producers efficient and maintains the genetic identity of the populations with a presumably homogeneous-heterozygous structure. As such, the main genetic variability of different characters is best when a larger number of populations are included (Hughes et al., 1997). Notwithstanding, in general in the *Capsicum* genus, percentages of

allogamy from 2-90% are reported depending on the locality, environment, and space between plants (Poza-Campodónico, 1983; Tansley, 1984).

In the principal components analysis (PCA) of quantitative variables, the principal components 1, 2, and 3 together explained 56% of the total variation, with values of 26%, 17%, and 13% respectively, and all of the collections were associated with one or some of these variables in particular. In PC1 the variables “plant width” and “fruiting period” received the most negative values and the variables “fruit weight” and “fruit width” had the highest positive values, leaving C11, C12, and C8 on one extreme of this axis and C3, C7, and C14 on the other (Figure 3). The results suggest a stronger association of C11, C12, and C8 to foliage characters, which according to Medina et al. (2006) are associated with characters of wild species. Within these collections fruit size also stood out, which was smallest in C12, and which according to Walsh and Hoot (2001) is also characteristic of wild types. On the contrary, the collections C3, C7, and C14 are related to characteristics of yield, possibly because of stronger anthropogenic selection exerted on them, since their characteristics represent some of the most commercially desirable characteristics (Walsh and Hoot, 2001; Votava et al., 2005). In PC2, the variables “hypocotyl length” and “stem length” received the highest negative values, while “placenta length,” “pedicel thickness,” and “seed size” represented the most positive values, which placed collections C13 and C2 on one extreme and C1 on the other.

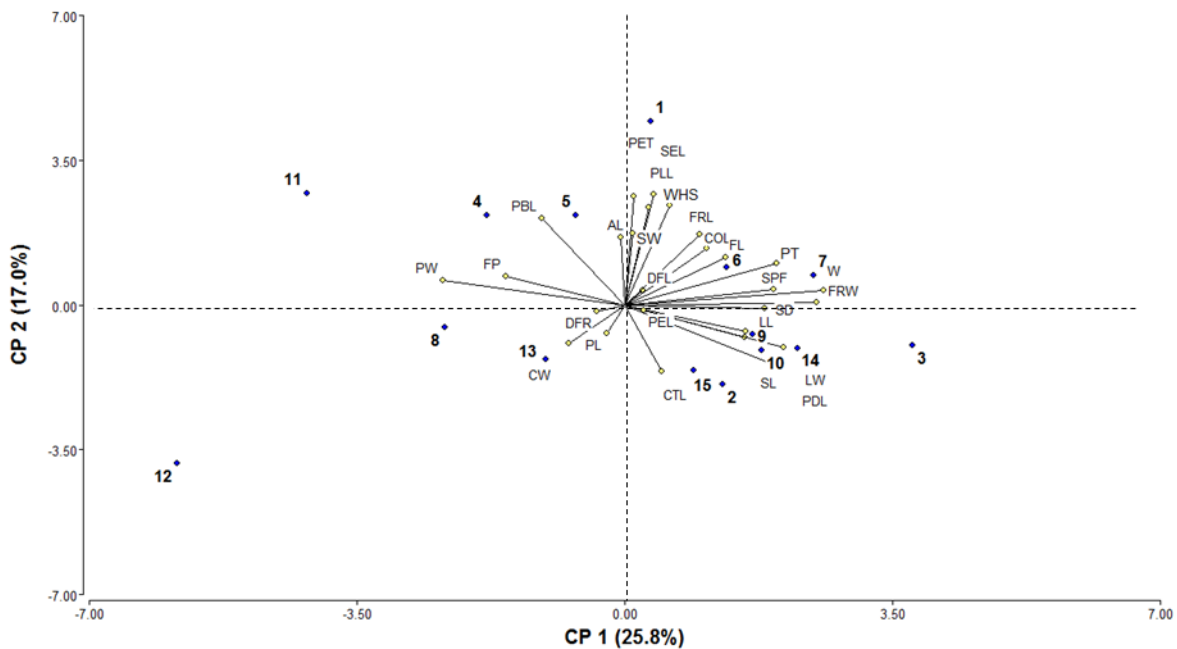


Figure 3. Biplot of 27 quantitative variables (capital letters) in 15 collections of manzano pepper (numbers). CW= cotyledon width; CTL= cotyledon length; SL= stem length; SD= stem

diameter; LL= leaf length; LW= leaf width; PL= plant length; PW= plant width; PBL= primary bud length; PEL= pedicel length; COL= corolla length; AL= anther length; FL= filament length; DFL= days to flowering; PF= fruiting period; DFR= days to fruiting; W= weight; FRL= fruit length; FRW= fruit width; PLL= placenta length= PDL= peduncle length; PT= pericarp thickness; PET= peduncle thickness; SEL= seed length; SW=seed width; SPF= number of seeds per fruit; WHS= weight of 100 seeds.

CONCLUSIONS

The numerical taxonomy analysis of the descriptors analyzed of the 15 collections showed that the fruit and flower structures included 65% of the descriptors analyzed. Of the qualitative descriptors, 50% showed variation in the degree of a characteristic, while the other 50% corresponded to binary states or more types of variation. Forty-nine percent of the qualitative descriptors exhibited polymorphisms, and plant structure showed the highest number of morphoalleles (64%). Seven unique states were found in C8 (1), C11 (2), and C12 (4), among which dense branching, bilocular fruit, and white corolla stood out as characters of agronomic importance. Due to their unique states, make their carrier ideal materials for use as stock in the development of recombinant lines and for future studies for the construction of genetic linkage maps. There was a spatial separation among four groups of collections based on multivariate qualitative and quantitative values by discriminant analysis and such results were confirmed by a phenogram. In the principal components analysis, the components 1, 2, and 3 explained 56% of the total variation. The first principal component was associated mainly with the variables of plant size, fruiting period, and fruit weight. This component included C11, C12, and C8 as collections with rustic appearance; and C3, C7, and C14 as collections with the most commercially desirable characteristics. The second principal component was associated with the variables of hypocotyl length, stem length, placenta length, pedicel thickness, and seed size, which were notable characters of C12, C2, and C1. The results indicate significant phenotypic variation in *C. pubescens* that would allow genetic improvement through selection of outstanding populations and a considerable range of combinations of desirable morphological characters in hybridization programs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Mexican National Council for Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y tecnología; CONACYT), for financing in the form of a scholarship for Master's Studies granted to Imelda Martínez Estrada.

REFERENCES

- Altieri, M. A. 1987. The significance of diversity in the maintenance of the sustainability of traditional agroecosystems. *ILEIA Newsletter* 3(2): 3-7.
- Alonso-Blanco, C., and M. Koornneef. 2000. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in plant science* 5(1): 22-29.
- Andrews, J. 1995. Peppers. The domesticated capsicums. New Edition. Austin University of Texas Press, USA. 186 p.
- Bran, R. A. A., B. Z. Castillo, R. Q. Madrigal, Á. R. Esquinca, y P. P. Díaz. 2012. Caracterización morfológica y molecular de la variabilidad genética del timpinchile (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum* sin. *aviculare*) en Chiapas. *Quehacer Científico en Chiapas* 1(13): 4-18.
- Castañón-Nájera, G., L. Latournerie-Moreno, M. Mendoza-Elos, A. Vargas-López, y H. Cárdenas-Morales. 2008. Colección y caracterización de chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Phyton* 77: 189-202.
- Crisci, J. V., y M. F. López. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la OEA, Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Wahington, D. C., USA. 133p.
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y Robledo C.W. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Elitzur, T., H. Nahum, Y. Borovsky, I. Pekker, Y. Eshed, and I. Paran. 2009. Co-ordinated regulation of flowering time, plant architecture and growth by FASCICULATE: the pepper orthologue of SELF PRUNING. *Journal of experimental Botany* 60(3): 869-880.
- Hughes, J. B., G. C. Daily, and P. R. Ehrlich. 1997. Population diversity: its extent and extinction. *Science* 278(5338): 689-692.
- Ibarra-Torres, P., E. Valadez-Moctezuma, M. Pérez-Grajales, J. Rodríguez-Campos, and M. E. Jaramillo-Flores. 2015. Inter-and intraspecific differentiation of *Capsicum annum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 181: 137-146.
- IPGRI, AVRDC y CATIE. 1995. Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación relativos a los Vegetales, Taipéi, Taiwán y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Jensen, R. J., M. J. Mcleoo, W. H. Eshbaugh, and S. I. Guttman. 1979. Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). *Taxon* 28:315-327.

- Lefebvre, V., A. Palloix, C. Caranta, and E. Pochard. 1995. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome* 38: 112-121.
- Loaiza-Figueroa, F., K. Ritland, J. A. Laborde-Cancino y S. D. Tanksley. 1989. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 165: 159-188.
- McLeod, M. J., S. I. Guttman, and W. H. Eshbaugh. 1982. Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Economic Botany* 36: 361-368.
- Manju, P. R., and I. Sreelathakumary. 2002. Genetic variability, heritability and genetic advance in hot chilli (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of Tropical Agriculture* 40: 4-6.
- Martín, N., and W. González. 1991. Caracterización de accesiones de chile (*Capsicum* spp). *Agronomía Mesoamericana* 2:31-39.
- Medina C. I., M. Lobo, y A. F. Gómez. 2006. Variabilidad fenotípica de poblaciones de ají y pimentón de la colección colombiana del género *Capsicum*. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7 (2): 25-39.
- Moreno del C. P. E., C. H. Avendaño A., R. Mora A., J. Cadena I., V. H. Aguilar R., y J. F. Aguirre M. 2011. Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (*Capsicum annuum* L.) del centro-norte de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1): 23-30.
- Moscone, E. A., M. Lambrou, A. T. Hunziker, and F. Ehrendorfer. 1993. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 186(3-4): 213-229.
- Orr, H. A. 2001. The genetics of species differences. *Trends in Ecology and Evolution* 16(7): 343-350.
- Palacios C. S., y M. A. García D. 2008. Caracterización morfológica de 93 accesiones de *Capsicum* spp del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira. *Acta agronómica* 57(4): 247-252.
- Pérez G., M. R. Castro B. 1998. Guía para la producción intensiva de chile manzano. Boletín de Divulgación número 1. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 17 p.
- Pickersgill, B. 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution* 25:683-691.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96: 129-133.
- Pozo-Campodonico, O. 1983. Estimates of natural cross-pollination in Serrano pepper (*Capsicum annuum* L.). *Capsicum Newsletter* 2: 113-115.

- Secretaría del Medio Ambiente. (2010). Las Orquídeas del Estado de México. Gobierno del Estado de México. México. 240 p.
- SNICS, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de semillas. 2014. Chile (*Capsicum annuum*): Guía técnica para la descripción varietal. SAGARPA, México. 25p.
- Solanki, S. S., P. K. Saxena, and I. C. Pandey. 1986. Genotypic paths to fruit yield in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Progressive Horticulture* 18 (3-4): 227-229.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution. In: Sixth International Congress on Soils. Proceedings International Society for Soils Culture. Luntern, Netherlands. p 650-663.
- Tanskey, S.D. 1984. High rates of cross-pollination in chile pepper. *HortScience* 19: 580-582.
- Van Hintum, Th. J. L. 1995. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: Core collections of plant genetic resources. Hodkin, T., A.D.H. Brown, and Th.J.L. van Hintum eds. Wiley Sayce Publication, United Kingdom. p 23-34.
- Villota-Cerón, D., M. L. Bonilla-Betancourt, H. Carmen-Carrillo, J. Jaramillo-Vásquez, y M. A. García-Dávila. 2012. Caracterización morfológica de introducciones de *Capsicum* spp. Existentes en el Banco de Germoplasma activo de Corpoica CI Palmira, Colombia. *Acta Agronómica* 61(1): 16-26.
- Votava, E.J., J. B. Baral, and P.W. Bosland. 2005. Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from Northern New Mexico, Colorado and Mexico. *Economic Botany* 59(1):8-17.
- Walsh, B. M. and S. B Hoot. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. *International Journal of Plant Sciences* 162(6): 1409-1418.

24/8/2016

RV: Manuscript received - ChileanJAR - Imelda Martínez Estrada

RV: Manuscript received - ChileanJAR

Jaime Mejía Carranza

mié 24/08/2016 10:39 a.m.

Bandeja de entrada

Para: pa-che-ca@hotmail.com <pa-che-ca@hotmail.com>; Juan Carlos Reyes Alemán <reyesaleman@hotmail.com>; Luis Miguel Vazquez García <lmvazquezg@uaemex.mx>;

cc: Jaime Mejía Carranza <meiia_15@hotmail.com>

Jaime Mejía Carranza

Profesor- Investigador

Centro Universitario Tenancingo

Universidad Autónoma del Estado de México

Km 1.5 carr. Tenancingo-Villa Guerrero

Tenancingo, Estado de México

C. P. 52400

Tel. +52 (722) 1407725

1407724

x179

De: Chilean Journal of Agricultural Research <info@chileanjar.cl>

Enviado: miércoles, 24 de agosto de 2016 10:24 a. m.

Para: Jaime Mejía Carranza

Asunto: Manuscript received - ChileanJAR

Dear **Mejía-Carranza, Jaime**

Dear **Mejía-Carranza, Jaime**

Your manuscript **Phenotypic variation among populations of capsicum pubescens in southern Mexico State** has been received. You have been assigned the following manuscript code: **CJAR160241**.

This system allows you to check on the status of your manuscript (review process, observations, etc.)

We remind you your access data:

USERNAME: **jmejiac@uaemex.mx**

PASSWORD: **e211c3**

Access the system through this link: www.chileanjar.cl

Sincerely,

Electronic Edition System

<https://outlook.live.com/owa/?viewmodel=ReadMessageItem&ItemID=AQMkADAwATY3ZmYAZS05ZjAyLTg5NmYtMDACLTAwCgBGAAAD8Gy4Nd0H1kCY...> 1/2

24/8/2016

RV: Manuscript received - ChileanJAR - Imelda Martines Estrada

Editorial Staff
Chilean Journal of Agricultural Research
INIA Chile

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Se encontraron 7 estados únicos en las colectas de chile manzano, de estos el 40% se encontró en la colecta 12 que está caracterizada por tener la corola de color blanco, Pérez y colaboradores (2004) mencionan que los materiales que presentan estados únicos son de prioridad de conservación ya que alguno de estos atributos pueden contribuir a algún valor potencial como los colores de los frutos.

En los 59 caracteres cualitativos evaluados se encontraron 29 en estado polimórfico lo que representa casi un 50 % de polimorfismo, en estudios realizados de caracterización morfológica en poblaciones de *Capsicum*, Medina y colaboradores (2006) encontraron 45 estados polimórficos de 47 caracteres evaluados, sin embargo evaluaron en conjunto a cinco de los *Capsicum* comerciales y algunos silvestres por lo cual su alto grado de polimorfismo entre especies.

El análisis de componentes principales explico el 65% de la variabilidad acumulada en los cuatro primeros componentes, las características que más aportaron en la realización de los componentes fueron de fruto, panta y flor. Sánchez y colaboradores (2010) en un estudio de caracterización de morfológica de chile de agua, encontró que los cuatro primeros componentes principales explicaron el 85% de la variabilidad con características de fruto, planta y flor. Cerón y colaboradores (2011) menciona que en los cinco primeros componentes principales explicaron el 83.4% de la variabilidad por descriptores de flor y fruto principalmente.

IX. CONCLUSION GENERAL

Existe variabilidad morfológica dentro de la especie de *Capsicum pubescens*. Se encontraron 7 estados únicos dentro de las 15 colectas de chile manzano, la colecta 12 fue la que presentó el mayor número de estados únicos (4 de 7) resaltando el color de corola blanco y color de hipocótilo blanco. La colecta 8 es la única que presenta macollamiento denso. Los principales polimorfismos encontrados fueron en fruto. De los 209 morfoalelos de los caracteres evaluados se encontraron 98 en las colectas de chile manzano.

El análisis discriminante separó a las colectas en 4 grupos definidos por algunas características como color de corola, color de fruto, formas y tamaños de frutos. En el análisis de componentes principales los cuatro primeros componentes explicaron el 65% de la variabilidad acumulada. Los resultados sugieren que se puede trabajar con estas colectas para estudios de mejoramiento genético gracias a la variabilidad que se encontró entre ellas.

X. REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

- Achal, S.; Lal S. D.; Pant C. E. 1986.** Variability studies in chilli. Progressive horticulture 18 (3-4) 270-272p.
- Alejos, V. L. P.; Aragón, M. M. C. y Cornejo, R. A. s. a.** Extracción y purificación de ADN página 14.
- Andrews, J. 1995.** Peppers. The domesticated capsicums. New Edicion. Austin Univesiti of Texas Pres. 186 p.
- Arqueología mexicana, 2009.** Catalogo visual de los chiles de México. Edición especial, Vol. 32. Bernstein, J.E. 1989. J. Am. Pediatric Med. Assoc. 81: 288-90
- Becerra, V. V. y Paredes, C. M. 2000.** Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica, Santiago, v. 60 n. 3.
- Brenman D.L. 1992.** J. Am. Acad Dermatd. 26: 91-3 Chad, D.A. 1990. Pain 42:387-90.
- Bolivar, A. M.; Rojas A. Garcia-Lugo P. 2014.** PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avan Biomed; 3: 25-33.
- Cerón, V. D.; Betancourt, B. M. L.; Carrillo, C. H.; Vásquez, J. J. y Dávila, G. M. A. 2012.** Caracterización morfológica de introducciones de *Capsicum spp.* Existentes en el Banco de Germoplasma activo de Corpoica C. I. Palmira, Colombia. Acta agronómica (en línea), consultado el 27 de junio de 2016.
- Crisci, J. V. y López, M. F. 1983.** Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la OEA, Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico, Wahington, D.C., USA. 133 p.
- D’Arcy. W. G. y Eshbaugh W.H. 1974.** New World peppers (*Capsicum*Solanaceae) north of Colombia. Baileya 19: 93-105.
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y Robledo C.W. 2015.** InfoStat versión 2015.Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- De la Loma J. L. 1970.** "Historia, modalidades, importancia y utilización de las mutaciones. 1er simposio Mexicano sobre mutaciones". Agrociencia Chapingo, México. 6-16.
- Dürüst, N. D. and Dürüst, Y. 1997.** Ascorbic acid and elements contents of Trabzon (Tukey). J. Agric. Food Chem.
- Engels, J. 1979.** La documentación en Centros de Recursos Genéticos. Turrialba, Costa Rica. CA TIE. 12 p.
- Escandón A. S., Pérez de la torre, M, Acevedo, A, Marcucci-Poltri, and Miyahima, I. (2005).** Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. Acta Horticulturae 683: 121-127.
- Eshbaugh, W. H. (1983).** The genus *Capsicum* (Solanaceae) in Africa. Bothalia 14: 845-848. Fawell, D. J. 1998. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. Food Chem. 62: 59-64
- Espinosa T., L.E. 2005.** Los Sistemas de Producción de Chile Manzano en México. Una evaluación técnica, financiera y comercial. Tesis de Maestría. Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. 134 p.
- Espinosa, T. L. E.; VILLA G. A. 2008.** Regiones Productoras de Chile Manzano. Revista Extensión al Campo. Año II. Núm. 07-08. Págs. 08-12.
- Espinosa, T. L.E. 2010.** Cultivo en invernadero, postcosecha y mercado del chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P). Tesis de Doctorado. Chapingo, México.
- Fawell, D. J. 1998.** A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. Food Chem. 62: 59-64
- Fierro, F. F. s. a.** Electroforesis de ADN. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO-FAOSTAT.** Trade. Consultado 31 de enero de 2012. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>.
- Franco, T. L. e Hidalgo, R. 2003.** Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- García, M. A. 2006.** Estudio de la diversidad genética de las accesiones de *Capsicum* spp del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de

Colombia – Sede Palmira. Tesis doctoral. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. 102 p.

González, O. A. 1985. Caracterización de 10 inducciones de chile picante (*Capsicum spp*) provenientes de varios países americanos en Turrialba, Tesis Magister Scientiae, Turrialba, costa Rica. Programa Universidad de Costa Rica CATIE 164p.

Heiser, D. V. and Pickersgill. 1969. Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Taxon* 18: 277-283.

Heiser C. B. (1976). Peppers-Capsicum (Solanaceae). In: Simmonds, N.W. (Ed). *Evolution of Crop Plants*. Longman. London. Pp. 265 – 268.

Hernández, V. 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.

IPGRI, 1980. International Board for plant Genetic resources. Guidelines for developing descriptor listo Rome.13 p.

IPGRI, 1983. International Board for plant Genetic resources. Genetic Resources of *Capsicum*. Roma, 49p.

IPGRI, AVRDC y CATIE. 1995. Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum spp.*). Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación relativos a los Vegetales, Taipéi, Taiwán y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.

Joseph, H., Anderson, R., Tatham, R., Black, W. 1992. *Multivariate dataAnalysis with Readings*.3rd Ed. Riverside.554 p.

Maroto, B. J. V. 2002. *Horticultura Herbácea Especial*. Ediciones Mundi-Prensa. 5a. Madrid, España. 702 p.

Medina C. I., M. Lobo, y A. F. Gómez. 2006. Variabilidad fenotípica de poblaciones de ají y pimentón de la colección colombiana del género *Capsicum*. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7 (2): 25-39.

Milla, A. (2006). *Capsicum* de capsas, cápsulas el pimiento. *Pimientos, Compendios de Horticultura*. Capítulo 2, pp. 21-31.

Mosso, O. M. 1994. Zonificación agroclimática para el cultivo de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en la sierra Norte de Puebla. Tesis de licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México 67 p.

- Morán, B. S. H., M. Ribero B, Y. García F. y P. Ramírez V. (2004).** Patrones isoenzimáticos de chiles criollos (*Capsicum annum* L.) de Yucatán, México. En: Chávez-Servia, J. L., Tuxill, J., Jarvis, D. I. (eds). pp. 83-89. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.
- Moran, B. S. H. 2008.** Caracterización biológica de chiles criollos (*Capsicum annum* L.) del sur del estado de Puebla. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Mozafar, A. 1994.** Plant vitamins: Agronomic, Physiological and Nutritional Aspects. CRC Press. Boca, Raton F1. 412p.202.
- Nei, M. 1973.** Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proc Nat Acad Sci USA 70: 3321-3326. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Newsletter Microbial. 2013.** La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. Núm 3.
- Laborde, C. J.; Pozo, C. O. 1982.** Pasado y presente del Chile en México. SARHINIA. México. Publicación especial no. 85. Folleto. 80p.
- Lantz PG, Abu al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. 2000.** Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. Biotechnol Annu Rev. 5:87-130.
- Latournerie, M. L.; Chávez, S. J. L.; Pérez, P. M.; Castañón, N. G.; Rodríguez, H. S. A.; Arias, R. L. M.; Ramírez, V. P. 2010.** Valoración in situ de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* Jacq) en Yaxcaba, Yucatán. Rev. Fitotecnia Mexicana 25 (1): 25-33.
- Leninger A. L. 1975.** Biochemistry. Worth Publishers, New York, EE.UU.
- Loaiza-Figueroa, F., Ritland K., Laborde-Cancino J. A. y Tanksley S. D. 1989.** Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 165: 159-188.
- López, L. P. y Pérez, B. D. 2015.** El Chile huacle (*Capsicum annum* sp.) en el estado de Oaxaca, México. Rev. AGROPRODUCTIVIDAD. p 38. ISSN-0188-7394.
- Long, S. J. 1986.** *Capsicum* y cultura. La historia del Chile. Fondo de Cultura Económico, México, 178 p.

- Tanksley (1989).** Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 165: 159-188. Maroto, B. J. V. 2002. *Horticultura Herbácea Especial*. Ediciones Mundi-Prensa. 5a. Madrid, España. 702 p.
- Palacio, M. J. D. 20133.** Protocolo para la colecta, transporte y conservación de tejido de robles para la obtención de ADN.
- Pérez-Galvez, A.; Hornero-Méndez D. y Mínguez-Mosquera M.I. 2004.** changes in the carotenoid metabolism in *Capsicum* fruits during application of modelized slow drying process for paprika production. *J. Agric. Food Chem.* 52: 518-522.
- Pardey, R. C.; García, D. M. A.; y Vallejo, C. F. A. 2006.** Caracterización morfológica de cien introducciones de *Capsicum* del Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. *Acta Agronómica*.
- Parker P. G., Snow A. A., Schug M. D.; Booton G. C. y Fuerst. 1998.** What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Pérez G., M. R. Castro B. 1998.** Guía para la producción intensiva de chile manzano. Boletín de Divulgación núm. 1. Programa Nacional de Investigación en Oleicultura. Depto. De fitotecnia. Chapingo, México. 17 p.
- Pérez G., M. 2002.** Estudio genético y fisiológico del crecimiento, rendimiento y calidad de fruto en chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P). Tesis de doctos en Ciencias Especialidad en Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 106 p.
- Pérez G. y Castro B. 2008.** El chile manzano [Book]. - México : UACH.
- Pérez G. y Castro B., 2010.** El chile manzano. México. Universidad Autónoma de Chapingo
- Phillips, W.; Rodríguez, H.; Fritz, P. 1995.** Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Powell, W. 1992.** Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In: Moss, J. P. ed. *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.

- Pozo C., O. 1983.** Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola en el Cultivo de Chile. Manual publicado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 59 p.
- Rallo, P.; Belaj, A.; de la Rosa, R.; Trujillo, I. 2002.** Marcadores moleculares. Córdoba. España.
- Rodríguez I, Barrera H. 2004.** La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 7:323-35.
- Ruiz, C. J. C. 2012.** Evaluación de sustratos y su efecto en el desarrollo de dos colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) Tesis de Licenciatura. Centro Universitario UAEM Tenancingo. p 11.
- Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Sánchez, M. D.; Grajales, P. M.; Pérez, R. J. E.; Pérez, M. E. del C. 2010.** Colecta y caracterización morfológica de chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca México Rev. Chapingo. Serie Horticultura 16(3) 169-176.
- Sanwen, H.; Baoxi Z.; Milbourne D.; Cardle L.; Guimei Y.; y Jiazhen. 2001.** Development of pepper SSR markers from sequence data bases. Euphytica 117(2): 163-167.
- Schloterer C. y Taus D. 1992.** Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res. 20: 211-215.
- SENASICA 2014.** Dirección General de Sanidad Vegetal. Relación de huertos de chile manzano Certificados para exportación del Estado de México a los estados Unidos de América con tratamiento de Irradiación.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010.** Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON). México. SAGARPA
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA 2013.** Chile manzano en invernadero.
- Sint D, Raso L, Traugott M. 2012.** Advances in multiplex PCR: balancing primerefficiencies and improving detection success. Methods Ecol Evol. 3:898-905.
- Smith, P. G. y C. B. Heiser Jr. 1957.** Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. Bulletin of the Torrey Botanical Club 84: 413-420.

- SNICS, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de semillas. 2014.** Chile (*Capsicum annuum*): Guía técnica para la descripción varietal. SAGARPA, México. 25p.
- Solanki, S. S.; Saxena, P. K.; Pandey I.C. 1986.** Genotypic paths to fruit yield in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Progressive Horticulture* 18 (3-4): 227-229.
- Steiner, A.1984.** The universal nutrient solution. In: Sixth International Congress on Soils. Proceedings International Society for Soils Culture. Luntern. 663-650.
- Stulnig T. M. y A. Amberger. 1994.** Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques* 16: 402-404.
- Takahashi, M.; Osawa, K.; Che-Tsung, T.; Abe, M. 1977.** *J. Pharm. Soc. Jap.* 97: 13724.
- Tanksley, S. 1983.** Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8. H; phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Topuz, A and F. Ozdemir. 2004.** Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sundried and dehydrated paprika. *Food Chem.* 86:509-515.
- Valadez E. y G. Kahl. 2000.** Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Vladimir, Pavlicek, A.; Flegr, J. 2001.** Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res* 18, 7213-7218.
- Wilches, M. A. V. 2014.** Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. Universidad Rafael Landívar Guatemala. Serial No. 15, página 1.
- Williams J.; Kubelik A.; Livak K.; Rafalski, J. & Tingey, S. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res* 18, 6531-6535.
- Zane, L.; Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002).** Strategies of microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

Zhou, Z.; Miwa M. and Hogestsu. (1999). Analysis of genetic structure of a *suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist* 144: 55-63.

XI. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Figuras para la caracterización de *Capsicum pubescens*, de acuerdo a los descriptores de IPGRI, 1995.

Figura 21. Forma de la hoja cotiledónea

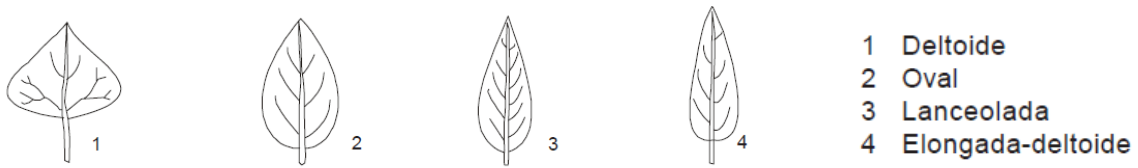


Figura 22. Pubescencia del tallo

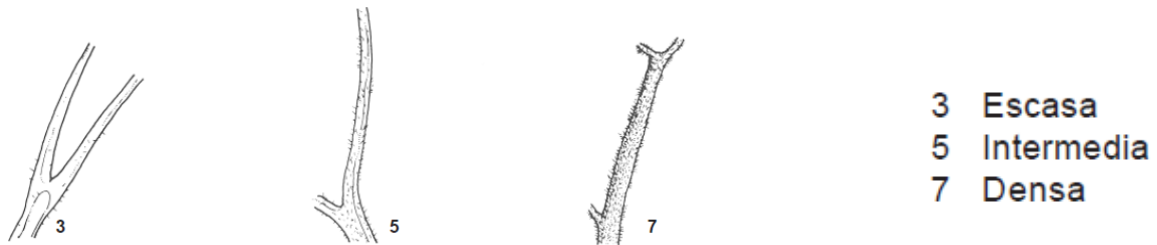


Figura 23. Hábito de crecimiento

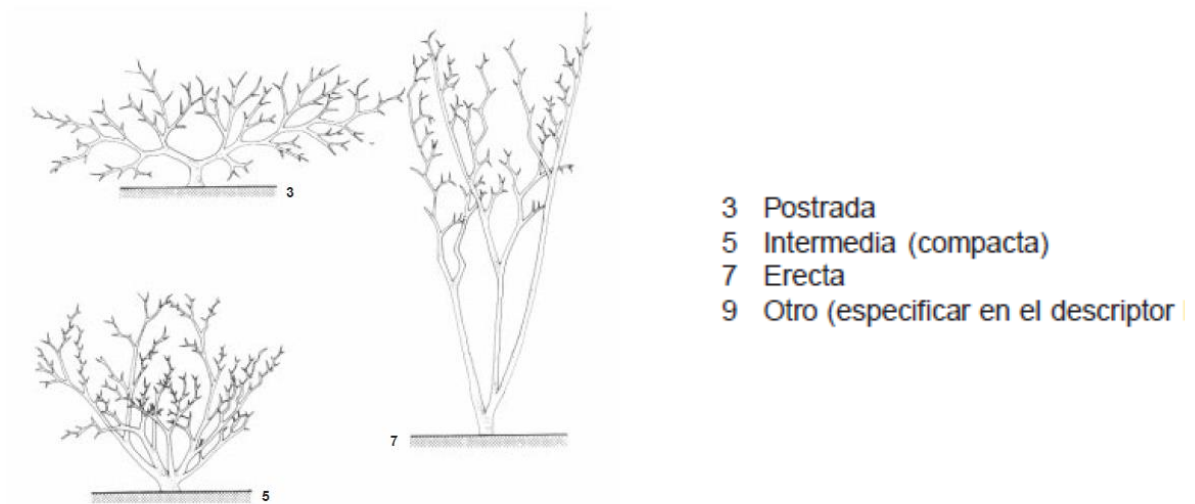


Figura 24. Forma de la hoja

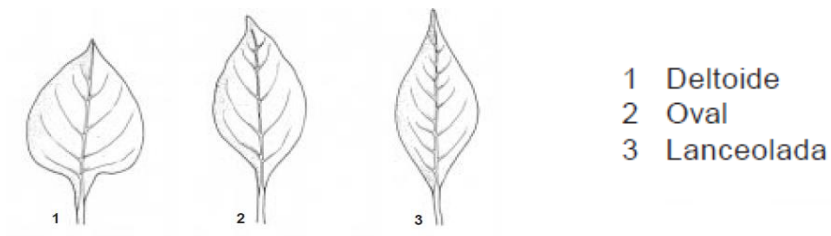


Figura 25. Pubescencia de la hoja



Figura 26. Posición de la flor



Figura 27. Margen del cáliz

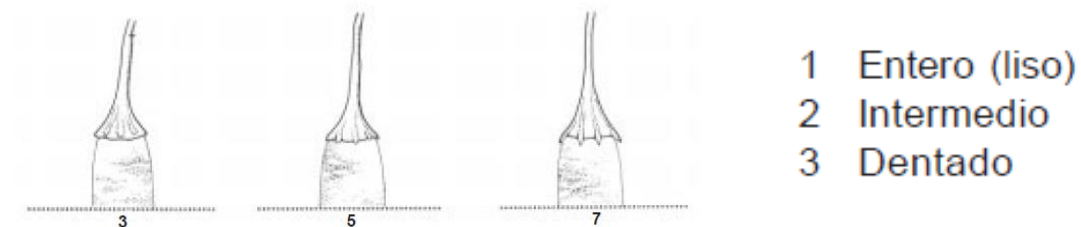


Figura 28. Constricción anular del cáliz

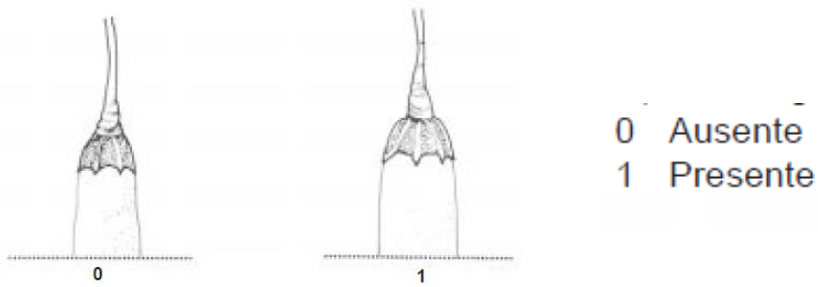


Figura 29. Forma del fruto en unión con el pedicelo

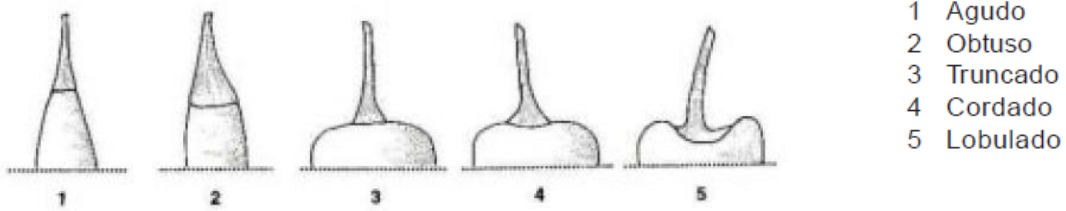


Figura 30. Cuello en la base del fruto

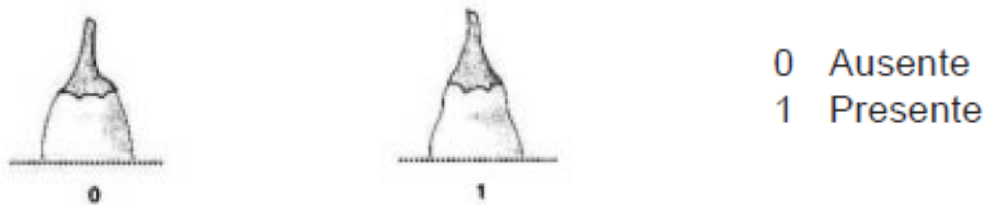


Figura 31. Forma del ápice del fruto

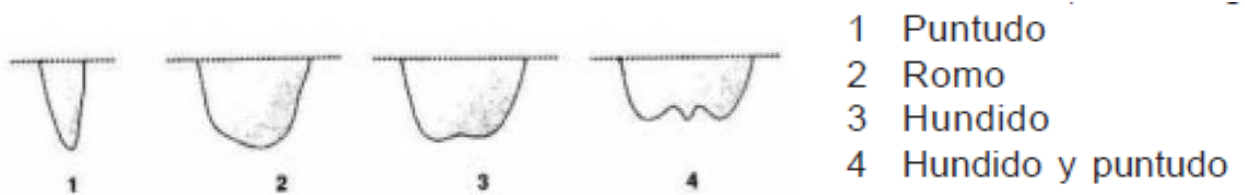


Figura 32. Ápice del fruto, vestigio de la floración

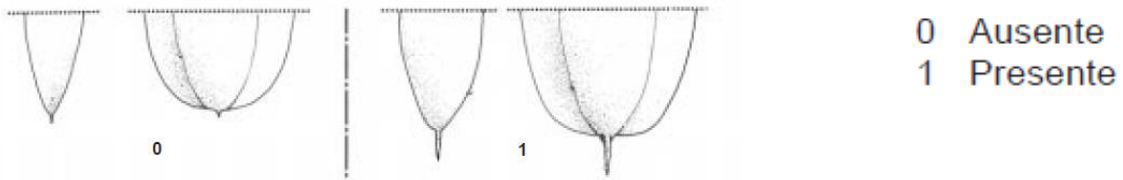
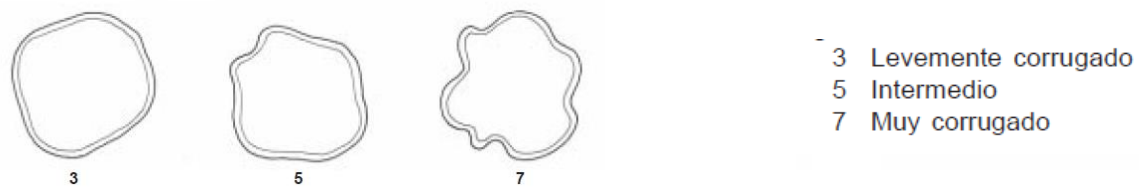
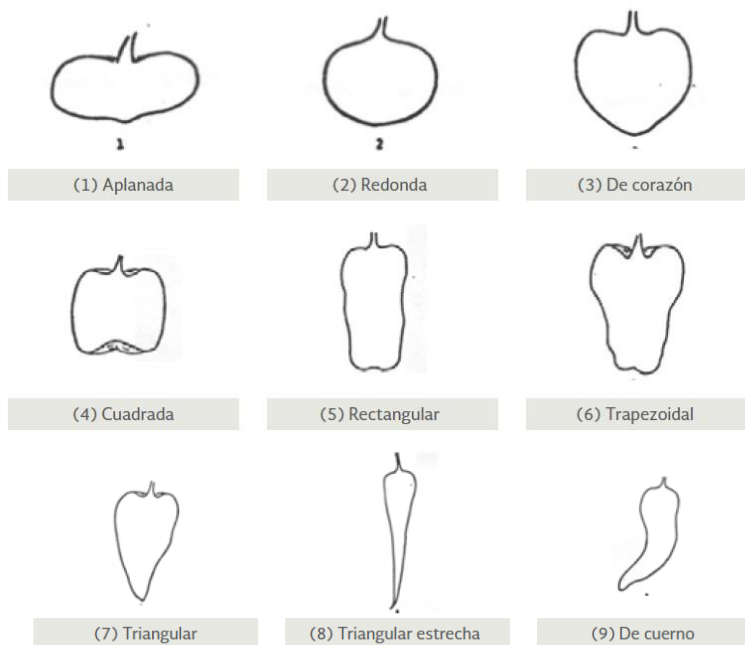


Figura 33. Arrugamiento transversal del fruto



11.2 Anexo 2. Figuras para la caracterización de la guía técnica para la descripción varietal de *Capsicum annum* L. del SNICS 2014.

Figura 34. Forma del fruto



11.3 Anexo 3. Descriptores utilizados de la Guía del SNICS (2014)

Cuadro 27. Descriptores utilizados de la guía SNICS

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|---|--|--|
| 1 | planta: hábito de crecimiento | Basal (amacollamiento) Dicotómica | |
| 2 | planta: entrenudos acortados en la parte superior | Ausente Presente | |
| 3 | planta: longitud del entrenudo | Corta Media Grande | Se tomó en centímetros |
| 4 | hoja: ampollado de la superficie | Débil Medio Fuerte | |
| 5 | Relación ancho/largo del fruto | Muy pequeña Pequeña Intermedia Grande Muy Grande | 1) 0.5 2) 0.6 a 1 3) 1.1 a 1.5 4) 1.6 a 2 5) 2 a 2.5 |
| 6 | forma predominante de la sección transversal (al nivel de la placenta) | Elíptica Angula Circular | |
| 7 | brillantez del fruto | Débil Media Fuerte | |
| 8 | Profundidad de la cavidad peduncular | Poco profunda Media Profunda | |
| 9 | posición del fruto | Erecta Intermedia Pendiente | |
| 10 | intensidad del color antes de la madurez | Claro Medio Obscuro | |
| 11 | forma del fruto | Aplanada Redonda Forma de corazón Cuadrada Rectangular Trapezoidal Triangular Triangulo estrecha Forma de cuerno | |
| 12 | contenido de capsaicina en la placenta | Presente Ausente | |
| 13 | profundidad de las depresiones interoculares | Ausentes o muy poco profundas Poco profundas Medias Profundas Muy profundas | |
| 14 | sabor del fruto | Dulce Pungente | |

Continuación Cuadro 27. Descriptores utilizados de la guía SNICS

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|---|---|--------------------------|
| 15 | posición de la placenta | Compacta Semi-distribuida Distribuida | |
| 16 | grosor del pedúnculo (en milímetros) | Delgado Intermedio Gruoso | Se tomó en milímetros |
| 17 | posición del pedúnculo | Erecto No Erecto | |
| 18 | textura del fruto | Liso Corchoso Rugoso | |

11.4 Anexo 4. Descriptores utilizados de la guía del IPGRI (1995)

Cuadro 28. Descriptores utilizados de la guía IPGRI

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|---------------------------------|---|-------------|
| 1 | color del hipocótilo | 1 blanco 2 verde 3 morado | |
| 2 | pubescencia del hipocótilo | 3 escasa 5 intermedia 7 densa | |
| 3 | color de la hoja cotiledónea | 1 verde claro 2 verde 3 verde oscuro 4 morado claro 5 morado 7 jaspeado (abigarrado) 8 amarillo | |
| 4 | forma de la hoja cotiledónea | 1 deltoide 2 oval 3 lanceolada 4 elongada-deltoide | |
| 5 | longitud de la hoja cotiledónea | se midió en hojas completamente desarrolladas (mm) | |
| 6 | ancho de la hoja cotiledónea | se midió en hojas completamente desarrolladas (mm) | |
| 7 | ciclo de vida | 1 anual 2 bianual 3 perene | |

Continuación Cuadro 28. Descriptores utilizados de la guía IPGRI

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|--|---|--|
| 8 | color del tallo | 1 verde 2 verde con rayas purpura 3 morado | |
| 9 | antocianina del nudo (toda la planta) | 1 verde 3 morado 5 morado 7 morado oscuro | |
| 10 | forma del tallo | 1 cilíndrico 2 angular 3 achatado (aplastado) | |
| 11 | pubescencia del tallo | 3 escasa 5 intermedia 7 densa | |
| 12 | altura de la planta (cuando empieza a madurar el primer furo (cm)) | 1) <25 2) 25-45 3) 46-65 4) 66-85 5) >85 | se registró en inicio de floración ya que son plantas con crecimiento indeterminado y en fructificación es difícil tomar la altura |
| 13 | ancho de la planta | se mide después de la primera cosecha en el punto más ancho | se registró en inicio de floración ya que son plantas con crecimiento indeterminado y en fructificación es difícil tomar el ancho |
| 14 | hábito de crecimiento | 3 postrada 5 intermedia (compacta) 7 Erecta | |
| 15 | longitud del tallo | mediad hasta la primer bifurcación después de la primera cosecha (cm) | |
| 16 | diámetro del tallo | medida en la parte media de la primer bifurcación después de la primera cosecha (cm) | |
| 17 | densidad de ramificación | 3 escasa 5 intermedia | 7 densa |
| 18 | densidad de hojas | 3 escasa 5 intermedia 7 densa | |
| 19 | color de la hoja | 1 amarillo 2 verde claro 3 verde 4 verde oscuro 5 morado claro 6 morado 7 jaspeado (abigarrado) | |

Continuación Cuadro 28. Descriptores utilizados de la guía IPGRI

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|--|---|------------------------|
| 20 | forma de la hoja | 1 deltoide 2 oval 3 lanceolada | |
| 21 | margen de la lámina foliar | 1 entera 2 ondulada 3 ciliada | |
| 22 | pubescencia de la hoja | 3 escasa 5 intermedia 7 densa | |
| 23 | longitud de la hoja madura | centímetros | |
| 24 | ancho de la hoja madura | parte más ancha de la hoja (cm) | |
| 25 | macollamiento | 3 escaso 5 intermedio 7 denso | |
| 26 | días a floración | días desde la siembra hasta que el 50% de la plantas presentó por lo menos una flor abierta | |
| 27 | número de flores por axila | 1 uno 2 dos 3 tres o más 4 muchas flores en racimo pero cada una en axila individual (crecimiento fasciculado) | |
| 28 | posición de la flor | 3 pendiente 5 intermedia 7 erecta | |
| 29 | color de la corola | 1 blanco 2 amarillo claro 3 amarillo 4 amarillo-verdoso 5 morado con la base blanca 6 blanco con la base purpura 7 blanco con el margen purpura 8 morado | |
| 30 | color de la mancha de la corola | 1 blanco 2 amarillo 3 verde-amarillento 4 verde 5 morado | |
| 31 | forma de la corola | 1 redonda 2 acampanulada | |
| 32 | longitud de la corola | 1) <1.5 2) 1.5-2.5 3) >2.5 | se tomó en centímetros |
| 33 | color de las anteras | 1 blanco 2 amarillo 3 azul pálido 4 azul 5 morado | |
| 34 | longitud de la antera | observadas en el momento de la antesis (mm) | |
| 35 | excección del estigma (antesis completa) | 3 inserto 5 al mismo nivel 7 exserto | |

Continuación Cuadro 28. Descriptores utilizados de la guía IPGRI

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|---|--|-------------|
| 36 | esterilidad masculina | 0 no 1 si | |
| 37 | pigmentación del cáliz | 0 ausente 1 presente | |
| 38 | margen del cáliz | 1 entero 2 intermedio 3 dentado | |
| 39 | constricción anular del cáliz | 0 ausente 1 presente | |
| 40 | días a la fructificación | desde el trasplante hasta que el 50% de las plantas tienen frutos en la primer y segunda bifurcación | |
| 41 | color del filamento | 1 blanco 2 amarillo 3 verde 4 azul 5 morado claro 6 morado | |
| 42 | días a la fructificación | desde el trasplante hasta que el 50% de las plantas tienen frutos en la primer y segunda bifurcación | |
| 43 | manchas o rayas antocianinas | 0 ausente 1 presente | |
| 44 | color del fruto en estado intermedio | 1 blanco 2 amarillo 3 verde 4 anaranjado 5 morado 6 morado oscuro | |
| 45 | cuajado del fruto (antes de la cosecha) | 3 bajo 5 intermedio 7 alto | |
| 46 | periodo de fructificación | desde el primer cuajado hasta la última formación del furo | |
| 47 | color del fruto en estado maduro | 1 blanco 2 amarillo-limón 3 amarillo- naranja pálido 4 amarillo-naranja 5 naranja pálido 6 naranja 7 rojo claro 8 rojo 9 rojo oscuro 10 morado 11 marrón 12 negro | |
| 48 | longitud del fruto | centímetros | |

Continuación Cuadro 28. Descriptores utilizados de la guía IPGRI

| No. | CARÁCTER | DESCRIPCIÓN DE LA GUÍA | MODIFICADOS |
|-----|--|---|--|
| 49 | ancho del fruto | centímetros | |
| 50 | peso del fruto | gramos | |
| 51 | longitud del pedicelo del fruto | centímetros | |
| 52 | espesor de la pared del fruto | milímetros | |
| 53 | forma del fruto en unión con el pedicelo | 1 agudo 2 obtuso 3 truncado 4 cordado 5 lobulado | |
| 54 | cuello en la base del fruto | 0 ausente 1 presente | |
| 55 | forma del ápice del fruto | 1 puntudo 2 romo 3 hundido 4 hundido y puntudo | |
| 56 | apéndice del fruto, vestigio de la floración | 0 ausente 1 presente | |
| 57 | arrugamiento transversal del fruto | 3 levemente corrugado 5 intermedio 7 muy corrugado | |
| 58 | número de lóculos | número más frecuentes | |
| 59 | persistencia pedicelo con el fruto | 3 fácil (leve) 5 intermedia 7 persistente | |
| 60 | persistencia pedicelo con el tallo | 3 fácil (leve) 5 intermedia 7 persistente | |
| 61 | longitud de la placenta | 1) <1/4 longitud del fruto 2) 1/4-1/2 longitud del fruto 3) >1/2 longitud del fruto | |
| 62 | condición de la mezcla varietal | 3 mezcla leve 5 mezcla intermedia 7 mezcla importante | |
| 63 | color de la semilla | 1 amarillo oscuro (paja) 2 marrón 3 negro | 1 café claro 2 café 3 café oscuro 4 café muy oscuro |
| 64 | superficie de la semilla | 1 lisa 2 áspera 3 rugosa | |
| 65 | tamaño de la semilla | 3 pequeña 5 intermedia 7 grande | milímetros |
| 66 | peso de 1000 semillas | gramos | peso de 100 semillas |
| 67 | numero de semillas por fruto | 1) < 20 2) 20-50 3) >50 | promedio |
| 68 | tipo de epidermis del fruto | 1 lisa 2 sermirugosa 3 rugosa | 2 áspera |

11.5 Anexo 5. Cuadros de resultados de taxonomía numérica

Cuadro 29. Descriptores, estados del descriptor y estados únicos encontrados en 59 caracteres cualitativos de chile manzano.

| Variable | Moda | Estados descriptor | Estados encontrados | Estados únicos | Accesión |
|---|----------------------------|--------------------|---------------------|----------------|----------|
| 1 Color del hipocótilo | Morado | 3 | 2 | blanco | 12 |
| 2 Pubescencia del hipocótilo | intermedia | 3 | 2 | | |
| 3 Color hoja cotiledónea | Verde | 8 | 2 | | |
| 4 Forma de hoja cotiledónea | Lanceolada | 4 | 2 | | |
| | TOTAL | 18 | 8 | 1 | |
| 1 Ciclo de vida | Perenne | 3 | 1 | | |
| 2 color hoja | vede | 7 | 3 | | |
| 3 antocianina del nudo | morado | 4 | 2 | | |
| 4 color tallo | verde con rayas purpura | 3 | 3 | | |
| 5 forma del tallo | cilíndrico | 3 | 1 | | |
| 6 pubescencia del tallo | intermedia | 2 | 3 | | |
| 7 hábito de crecimiento | erecto | 3 | 2 | | |
| 8 hábito de crecimiento * | dicotómica | 2 | 1 | | |
| 9 densidad de ramificación | intermedia | 3 | 3 | | |
| 10 macollamiento | escaso | 3 | 2 | denso | 8 |
| 11 densidad de hojas | intermedio | 3 | 2 | | |
| 12 forma de la hoja | oval | 3 | 3 | | |
| 13 margen de la lámina foliar | entera | 3 | 1 | | |
| 14 pubescencia de la hoja | intermedia | 3 | 3 | | |
| 15 ampollado de la hoja | medio | 3 | 1 | | |
| 16 entrenudos acortados en la parte superior | presente | 2 | 1 | | |
| | TOTAL | 50 | 32 | 1 | |
| 1 posición de la flor | erecta | 3 | 1 | | |
| 2 color de la corola | morado | 8 | 2 | blanco | 12 |
| 3 mancha de la corola | blanca | 5 | 1 | | |
| 4 forma de la corola | acampanulada | 2 | 1 | | |
| 5 color de las anteras | morado | 5 | 2 | amarillo | 12 |
| 6 color filamento | morado | 6 | 2 | blanco | 12 |
| 7 excercion del estigma | excerto | 3 | 3 | | |
| 8 esterilidad masculina | ausente | 2 | 1 | | |
| 9 pigmentación del cáliz | ausente | 2 | 1 | | |
| 10 constricción anular del cáliz | presente | 2 | 1 | | |
| 11 margen del cáliz | dentado | 3 | 1 | | |
| 12 numero de flores por axila | una | 4 | 1 | | |
| | TOTAL | 45 | 17 | 3 | |

Continuación cuadro 29. Descriptores, estados encontrados y estados únicos encontrados en 59 caracteres cualitativos de chile manzano.

| Variable | Moda | Estados descriptor | Estados encontrados | Estados únicos | Accesión |
|---|--------------|--------------------|---------------------|----------------|----------|
| 1 forma del fruto unión con pedicelo | cordado | 5 | 1 | | |
| 2 cuello en la base del fruto | presente | 2 | 1 | | |
| 3 forma del ápice del fruto | hundido | 4 | 1 | | |
| 4 apéndice vestigio de la floración | ausente | 2 | 1 | | |
| 5 arrugamiento transversal del fruto | intermedio | 3 | 2 | | |
| 6 tipo de epidermis | lisa | 3 | 1 | | |
| 7 condición de la mezcla varietal | leve | 3 | 1 | | |
| 8 persistencia pedicelo con tallo | persistente | 3 | 2 | medio | 11 |
| 9 persistencia pedicelo con el fruto | persistente | 3 | 2 | | |
| 10 número de lóculos | tres | 3 | 2 | 2 | 11 |
| 11 cuajado del fruto | intermedio | 3 | 3 | | |
| 12 color fruto estado intermedio | verde | 6 | 1 | | |
| 13 color fruto estado maduro | naranja | 6 | 2 | | |
| 14 forma del fruto | intermedio | 9 | 2 | | |
| 15 posición del fruto | pendiente | 3 | 1 | | |
| 16 relación ancho largo del fruto | pequeña | 5 | 2 | | |
| 17 forma predominante de la sección longitudinal | oval | 3 | 2 | | |
| 18 intensidad color fruto maduro | medio | 3 | 1 | | |
| 19 brillantez del fruto | media | 3 | 1 | | |
| 20 profundidad de la cavidad interlocular | presente | 3 | 1 | | |
| 21 cavidad pedúncular | presente | 2 | 1 | | |
| 22 profundidad de depresión interlocular | media | 5 | 3 | | |
| 23 sabor | pungente | 2 | 1 | | |
| 24 contenido de capsaicina en la placenta | presente | 2 | 1 | | |
| 25 posición de la placenta | compacta | 3 | 1 | | |
| 26 color de la semilla | café oscuro | 4 | 3 | | |
| 27 superficie de la semilla | áspera | 3 | 1 | | |
| | TOTAL | 96 | 41 | 2 | |

Cuadro 30. Clasificación de 59 caracteres cualitativos y 27 cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de 15 colectas de chile manzano.

| Variable | | Cualitativa | | | Cuantitativa | |
|-----------|---|-------------|--------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | | Binaria | Multiestado lógico | Multiestado no lógico | Continua | Discontinua |
| 1 | Color del hipocótilo | | | 1 | | |
| 2 | Pubescencia del hipocótilo | | 1 | | | |
| 3 | Color hoja cotiledónea | | | 1 | | |
| 4 | Forma de hoja cotiledónea | | | 1 | | |
| 5 | Ancho de hoja cotiledónea | | | | 1 | |
| 6 | largo de la hoja cotiledónea | | | | 1 | |
| | SUMA | | 1 | 3 | 2 | 0 |
| 1 | Ciclo de vida | | 1 | | | |
| 2 | Color del tallo | | | 1 | | |
| 3 | Antocianina del nudo | | | 1 | | |
| 4 | Forma del tallo | | | 1 | | |
| 5 | Pubescencia del tallo | | 1 | | | |
| 6 | Altura de la planta | | | | 1 | |
| 7 | Habito de crecimiento | | | 1 | | |
| 8 | Hábito de crecimiento * | 1 | | | | |
| 9 | Ancho de la planta | | | | 1 | |
| 10 | Longitud del tallo | | | | 1 | |
| 11 | Diámetro del tallo | | | | 1 | |
| 12 | Densidad de ramificación | | 1 | | | |
| 13 | Macollamiento | | 1 | | | |
| 14 | Entrenudos acortados en la parte superior * | 1 | | | | |
| 15 | Ampollado de la superficie de la hoja * | | 1 | | | |
| 16 | Densidad de hojas | | 1 | | | |
| 17 | Color de la hoja | | | 1 | | |
| 18 | Forma de la hoja | | | 1 | | |

Continuación Cuadro 30. Clasificación de 59 caracteres cualitativos y 27 cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de 15 colectas de chile manzano.

| Variable | | Cualitativa | | | Cuantitativa | |
|-----------|-------------------------------|-------------|--------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | | Binaria | Multiestado lógico | Multiestado no lógico | Continua | Discontinua |
| 19 | Margen de la hoja | | | 1 | | |
| 20 | Pubescencia de la hoja | | 1 | | | |
| 21 | longitud de entrenudos* | | | | 1 | |
| 22 | Ancho hoja madura | | | | 1 | |
| 23 | longitud hoja madura | | | | 1 | |
| 24 | Longitud pedicelo del fruto* | | | | 1 | |
| | SUMA | 2 | 7 | 7 | 8 | 0 |
| 1 | Días a floración | | | | | 1 |
| 2 | Número de flores por axila | | | 1 | | |
| 3 | Posición de la flor | | | 1 | | |
| 4 | Color de la corola | | | 1 | | |
| 5 | Color mancha de la corola | | | 1 | | |
| 6 | Forma de la corola | | | 1 | | |
| 7 | Longitud de corola | | | | 1 | |
| 8 | Color de las anteras | | | 1 | | |
| 9 | Longitud de la antera | | | | 1 | |
| 10 | Color del filamento | | | 1 | | |
| 11 | Longitud del filamento | | | | 1 | |
| 12 | Exserción del estigma | | 1 | | | |
| 13 | Esterilidad masculina | 1 | | | | |
| 14 | Pigmentación del cáliz | 1 | | | | |
| 15 | Margen del cáliz | | | 1 | | |
| 16 | Constricción anular del cáliz | 1 | | | | |
| | SUMA | 3 | 1 | 8 | 3 | 1 |

Continuación Cuadro 30. Clasificación de 59 caracteres cualitativos y 27 cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de 15 colectas de chile manzano.

| Variable | | Cualitativa | | | Cuantitativa | |
|----------|---|-------------|--------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | | Binaria | Multiestado lógico | Multiestado no lógico | Continua | Discontinua |
| 1 | Días a la fructificación | | | | | 1 |
| 2 | Manchas o rayas antocianinicas | 1 | | | | |
| 3 | Color fruto estado intermedio | | | 1 | | |
| 4 | Color fruto estado maduro | | | 1 | | |
| 5 | Cuajado del fruto | | 1 | | | |
| 6 | Periodo de fructificación | | | | | 1 |
| 7 | Forma del fruto | | | 1 | | |
| 8 | Longitud del fruto | | | | 1 | |
| 9 | Ancho del fruto | | | | 1 | |
| 10 | Peso del fruto | | | | 1 | |
| 11 | Brillantez del fruto | | 1 | | | |
| 12 | Sabor del fruto * | 1 | | | | |
| 13 | Longitud pedicelo del fruto | | | | 1 | |
| 14 | Grosor del pedúnculo * | | | | 1 | |
| 15 | Posición del fruto * | | | 1 | | |
| 16 | Espesor de la pared del fruto | | | | 1 | |
| 17 | Profundidad de la depresión interocular * | | | 1 | | |
| 18 | Posición de la placenta * | | 1 | | | |
| 19 | Forma del fruto unión con el pedicelo | | | 1 | | |
| 20 | Cuello en la base del fruto | 1 | | | | |
| 21 | Forma del ápice del fruto | | | 1 | | |

Continuación Cuadro 30. Clasificación de 59 caracteres cualitativos y 27 cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de 15 colectas de chile manzano.

| Variable | | Cualitativa | | | Cuantitativa | |
|-----------|---|-------------|--------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | | Binaria | Multiestado lógico | Multiestado no lógico | Continua | Discontinua |
| 22 | Apéndice del fruto, vestigio de la floración | 1 | | | | |
| 23 | Arrugamiento transversal del fruto | | 1 | | | |
| 24 | Forma predominante de la sección longitudinal * | | | 1 | | |
| 25 | Forma predominante de la sección transversal * | | 1 | | | |
| 26 | Número de lóculos | | | 1 | | |
| 27 | Tipo de epidermis del fruto | | | 1 | | |
| 28 | Persistencia pedicelo con fruto | | 1 | | | |
| 29 | Persistencia pedicelo con tallo | | 1 | | | |
| 30 | Longitud de la placenta | | | | 1 | |
| 31 | Relación ancho/largo del fruto * | | | 1 | | |
| 32 | contenido de capsaicina en la placenta | 1 | | | | |
| 33 | Brillantez del fruto* | | 1 | | | |
| 34 | Condición de la mezcla varietal* | | 1 | | | |
| | SUMA | 5 | 9 | 11 | 7 | 2 |

Continuación Cuadro 30. Clasificación de 59 caracteres cualitativos y 27 cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de 15 colectas de chile manzano.

| Variable | | Cualitativa | | | Cuantitativa | |
|----------|------------------------------|-------------|--------------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | | Binaria | Multiestado lógico | Multiestado no lógico | Continua | Discontinua |
| 1 | Color de la semilla | | | 1 | | |
| 2 | Superficie de la semilla | | | 1 | | |
| 3 | Tamaño de la semilla | | | | 1 | |
| 4 | Diámetro de la semilla | | | | 1 | |
| 5 | Peso de 1000 semillas | | | | 1 | |
| 6 | Número de semillas por fruto | | | | 1 | |
| | SUMA | | | 2 | 4 | |