



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSGRADO FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**HOMOGENIZACION MOLECULAR DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* DEL CHILE CM-334, SU MICROPROPAGACIÓN Y USO COMO  
PORTA INJERTO DE *Capsicum pubescens* R & P**

**ABIMAE LÓPEZ LÓPEZ**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER LE GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: **HOMOGENIZACIÓN MOLECULAR DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* DEL CHILE CM-334, SU MICROPROPAGACIÓN Y USO COMO PORTA INJERTO DE *Capsicum pubescens* R & P** realizada por el alumno: **Abimael López López**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERA:** \_\_\_\_\_  
**DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ**

**ASESORA:** \_\_\_\_\_  
**DRA. EMMA ZA VALETA MEJÍA**

**ASESORA:** \_\_\_\_\_  
**DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA**

**ASESOR:** \_\_\_\_\_  
**DR. MARIO PÉREZ GRAJALES**

**ASESORA:** \_\_\_\_\_  
**DRA. OLGA GÓMEZ RODRÍGUEZ**

**ASESOR:** \_\_\_\_\_  
**DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA**

**Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Octubre de 2013**

**HOMOGENIZACION MOLECULAR DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici*  
DEL CHILE CM-334, SU MICROPROPAGACIÓN Y USO COMO PORTA  
INJERTO DE *Capsicum pubescens* R & P**

Abimael López López, Dr.  
Colegio de Posgraduados, 2013

**RESUMEN**

El Criollo de Morelos 334 es altamente resistente a *Phytophthora capsici* L., quien es responsable de 70 – 80% de las pérdidas en la producción. *P. capsici* produce una enfermedad conocida como marchitez, de rápida dispersión y que causa la pudrición de la raíz. En el presente trabajo se realizó una caracterización morfológica y molecular de una población del criollo de Morelos mediante el uso de RAPDS con el objetivo de realizar una selección en una población de CM-334, los resultados de este análisis muestran que la población es genéticamente homogénea con un nivel de similitud del 100%. Los datos obtenidos de la caracterización permitirán el registro de la línea CM-334. Por otro lado, dado que el genotipo CM-334 es resistente a *P. capsici*, es un buen candidato para utilizarlo en un programa de mejoramiento. Aunque existe incompatibilidad genética entre *C. annuum* y *C. pubescens*, se desarrolló un protocolo de micropopagación usando el CM-334 como portainjerto de brotes de *C. pubescens* bajo condiciones in vitro. El medio apropiado para la multiplicación y conservación del injerto fue MS con ANA+BA (0.01+0.1 mg L<sup>-1</sup>) +TRIA (10 µg L<sup>-1</sup>). Una vez que se logró el prendimiento de 100% los microinjertos, y después de una etapa de aclimatación, los injertos fueron inoculados con 3x10<sup>5</sup> zoosporas de *P. capsici*. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran, que el CM-334 puede ser utilizado como portinjerto del chile manzano para el control de la marchitez.

**Palabras claves:** *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, homogeneidad, injerto in vitro, *C. pubescens*.

**MOLECULAR HOMOGENIZATION TO RESISTANCE TO *Phytophthora capsici*  
OF CHILI PEPPER CM-334, MICROPROPAGATION AND THEIR USE LIKE  
ROOTSTOCK OF *Capsicum pubescens* R & P**

Abimael López López Dr.

Colegio de Posgraduados, 2013

**ABSTRACT**

The Criollo de Morelos 334 is highly resistant to *Phytophthora capsici* L., who is responsible for 70-80% of the losses in production. *P. capsici* produces a disease known as withering, rapid dispersal and causing root rot. In this paper we conducted a morphological and molecular characterization of a native population of Morelos by using RAPD in order to make a selection in a population of CM-334, the results of this analysis show that the population is genetically homogeneous a similarity level of 100%. The characterization data can be used to obtain a pure line of CM-334. Moreover, since the CM-334 genotype is resistant to *P. capsici*, is a good candidate for use in a breeding program. Although genetic incompatibility between *C. annuum* and *C. pubescens*, we developed a micropropagation protocol using the CM-334 as rootstock sprouts *C. pubescens* under in vitro conditions. The appropriate medium for multiplication and preservation of the graft was MS with NAA + BA (0.01 +0.1 mg L<sup>-1</sup>) TRIA (10 mg L<sup>-1</sup>). Once achieved 100% engraftment of the micrografts, and after a period of acclimation, the grafts were inoculated with zoospores of *P. capsici* 3x10<sup>5</sup>. The results obtained in this work show that the CM-334 as rootstock of Manzano hot pepper for wilt control.

**Index words:** *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, homogeneity variety, grafting in vitro, *C. pubescens*.

## **DEDICATORIA**

A mis amados padres: Sr. Atristaín López (siempre pensé y ahora estoy convencido, eres un roble) y Sra. Celia López Castellanos, fuiste una mujer con carácter, no te doblegabas ni por enfermedad, gracias por enseñarme lo que es la voluntad.

A mis hermanos, Jorge, Javier, Elvia e Irma, porque siempre tengo bellos recuerdos de cuando niño y jóvenes. Los amo

A Lety, por permitirme conocerte, enseñarme lo bello del amor, motivarme y estar conmigo en los momentos más difíciles que he vivido contigo hasta ahora.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme los medio económicos necesarios en mis estudios de posgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo económico durante la terminación de mi tesis.

A la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez por confiar en mi persona, tenerme paciencia y respaldarme en los momentos de dificultad.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por ser una persona con determinación y carácter. Personalidad que me hizo esforzarme, comprometerme y exigirme más en aras de ser mejor tanto en mi vida académica como personal. Dra. Emma, muchas gracias por ese gesto de solidaridad en momentos de necesidad.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por ofrecerme su amistad,

Al Dr. Mario Pérez Grajales porque siempre vi en él un amigo. Dr. Mario, muchas gracias por toda su confianza y paciencia.

A la Dra. Olga Gómez Rodríguez por ser esa mano adicional en el desarrollo de mis experimentos. Dra. Olga, muchas gracias por todas las atenciones que tuviste conmigo.

Al Dr. Gregorio Arellano Ostoia por darme la oportunidad de ampliar mi visión de opciones en la investigación y su aplicación en el campo agrícola.

A mis compañeros del laboratorio: Carlos, Moisés, Yolanda, Lupita, Alba, Edgar, Tony, Erika, Héctor E, J. Emmanuel y H. Javier, por compartir su tiempo y ayuda en los momentos requeridos.

# CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	<b>x</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>VARIABILIDAD GENÉTICO MOLECULAR DEL CHILE (<i>Capsicum annuum</i> L.) CRIOLLO DE MORELOS 334 RESISTENTE A <i>Phytophthora capsici</i></b>	
INTRODUCCION .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	2
<b>Diversidad genética y resistencia a <i>Phytophthora capsici</i>:</b> .....	<b>3</b>
MATERIALES Y METODOS .....	8
<b>Obtención de platas de CM-334</b> .....	<b>8</b>
<b>Extracción DNA</b> .....	<b>8</b>
<b>Cuantificación e integridad del DNA</b> .....	<b>9</b>
<b>Perfiles de DNA mediante RAPD</b> .....	<b>9</b>
<b>Electroforesis en gel de Poliacrilamida</b> .....	<b>10</b>
<b>Análisis estadístico de datos moleculares</b> .....	<b>10</b>
RESULTADOS Y DISCUSION .....	11
Plantas de CM-334.....	11
Calidad, rendimiento e Integridad del DNA obtenido .....	11
PERFILLES RAPD-PCR .....	12
CONCLUSIONES .....	17
LITERATURA CITADA .....	17

<b>CAPITULO II.....</b>	<b>22</b>
<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE UNA LINEA PURA DE CM-334 (<i>Capsicum annuum</i> L.) RESISTENTE A <i>Phytophthora capsici</i></b>	
RESUMEN .....	22
INTRODUCCION .....	23
REVISION DE LITERATURA.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
<b>Obtención de una línea genéticamente homogénea de criollo de Morelos 334 .....</b>	<b>26</b>
<b>Evaluación de Resistencia a <i>Phytophthora capsici</i> Leonian.....</b>	<b>26</b>
<b>Caracterización Morfológica.....</b>	<b>27</b>
<b>Caracterización Molecular .....</b>	<b>29</b>
<b>Cuantificación e integridad del DNA .....</b>	<b>29</b>
<b>Perfiles de DNA mediante RAPD .....</b>	<b>30</b>
<b>Electroforesis en gel de Poliacrilamida .....</b>	<b>30</b>
<b>Análisis estadístico de datos moleculares .....</b>	<b>31</b>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
Caracterización Molecular .....	37
<b>Perfiles RAPD-PCR .....</b>	<b>37</b>
CONCLUSIÓN.....	40
LITERATURA CITADA .....	40
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>43</b>
<b>MICROPROPAGACIÓN DEL CHILE CRIOLLO DE MORELOS 334 (<i>Capsicum annuum</i> L.) Y USO POTENCIAL COMO PORTA INJERTO DE <i>C. pubescens</i> R &amp; P</b>	
RESUMEN .....	43
INTRODUCCIÓN .....	44
MATERIALES Y METODOS .....	47
<b>Material Vegetal .....</b>	<b>47</b>
<b>Establecimiento <i>in vitro</i> del criollo CM-334.....</b>	<b>47</b>
<b>Desinfección de semillas.....</b>	<b>47</b>
<b>Siembra <i>in vitro</i>.....</b>	<b>48</b>

<b>Multiplicación <i>in vitro</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>Injerto <i>in vitro</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>Crecimiento del injerto y enraizamiento del patrón <i>in vitro</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>Aclimatación del injerto.....</b>	<b>50</b>
<b>Funcionalidad y resistencia del injerto a <i>Phytophthora capsici</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>Análisis estadístico de datos .....</b>	<b>52</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>Desinfección y siembra <i>in vitro</i> de semillas de CM-334 .....</b>	<b>52</b>
<b>Multiplicación <i>in vitro</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>Injerto <i>in vitro</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>Crecimiento y enraizamiento <i>in vitro</i> del injerto .....</b>	<b>58</b>
<b>Aclimatación del injerto.....</b>	<b>60</b>
<b>Evidenciando la resistencia del injerto a <i>Phytophthora capsici</i> .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>63</b>

## INDICE DE CUADROS

### CAPITULO I

#### VARIABILIDAD GENÉTICO MOLECULAR DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) CRIOLLO DE MORELOS 334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici*

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de chile CM-334. ....	10
Cuadro 2. Análisis de varianza de lecturas de pureza y concentración de DNA de plantas de chile CM-334.....	12
Cuadro 3. Numero de bandas amplificadas por iniciadores aleatorios en una población de 96 plantas de CM-334. ....	13

### CAPITULO II

#### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE UNA LINEA PURA DE CM-334 (*Capsicum annuum* L.) RESISTENTE A *Phytophthora capsici*

Cuadro 1. Descriptores cualitativos y cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de una línea de criollo de Morelos 334. ....	27
Cuadro 2. Secuencia de iniciadores aleatorios usados en estudio de homogeneidad genético molecular de criollo de Morelos 334 multiplicado por tres generaciones de autopolinización.....	30
Cuadro 3. Informe técnico de la caracterización morfológica de “línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a <i>Phytophthora capsici</i> ”.....	32

### CAPITULO III

#### MICROPROPAGACIÓN DEL CHILE CRIOLLO DE MORELOS 334 (*Capsicum annuum* L.) Y USO POTENCIAL COMO PORTA INJERTO DE *C. pubescens* R & P

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección superficial y su efecto en % de germinación de semillas de chile ( <i>Capsicum annuum</i> L), criollo de Morelos 334 (CM-334). ....	48
Cuadro 2. Tratamientos hormonales y su efecto en yemas axilares de tallos del chile ( <i>Capsicum annuum</i> L) CM-334. ....	49

<b>Cuadro 3. Tipo de injerto entre CM-334 y <i>Capsicum pubescens</i> y medios solidos con o sin hormonas para injerto <i>in vitro</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>Cuadro 4. Medio MS con diferentes hormonas, concentración y combinación de las mismas usado como tratamientos en la inducción de raíces y crecimiento <i>in vitro</i> del injerto.....</b>	<b>52</b>
<b>Cuadro 5. Efecto del tiempo de exposición en etanol al 70% y a diferentes concentraciones de cloro comercial, en el porcentaje de germinación de semillas de CM-334 establecidas en MS (Murashige y Skoog, 1962). .....</b>	<b>54</b>
<b>Cuadro 6. Comparación de medias de las variables usadas para medir el efecto de los diferentes tratamientos hormonales en explantes de CM-334 para su multiplicación <i>in vitro</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>Cuadro 7. Tipo de injerto entre CM-334 y <i>Capsicum pubescens</i> y tipo de medio semisólido con o sin hormonas para promover mayor cicatrización del injerto <i>in vitro</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>Cuadro 8. Comparación de medias de las variables usadas para determinar medio más apropiado para crecimiento <i>in vitro</i> del injerto de <i>Capsicum pubescens</i>. .....</b>	<b>58</b>
<b>Cuadro 9. Comparación de la sobrevivencia a la aclimatación de plantas injertadas de <i>C. pubescens</i> con y sin raíz. ....</b>	<b>61</b>
<b>Cuadro 10. Comparación de medias de % de sobrevivencia a <i>Phytophthora capsici</i> de las especies tratadas.....</b>	<b>62</b>

## INDICE DE FIGURAS

### CAPITULO I

#### VARIABILIDAD GENÉTICO MOLECULAR DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) CRIOLLO DE MORELOS 334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici*

- Figura 1.** Huellas de DNA en gel de poliacrilamida de doble fase. La bandas polimórficas están señaladas en la imagen con flechas. Las etiquetas en la imagen indican el primer utilizado. Carriles extremos corresponden a marcado de peso molecular de 1 kb de Fermentas. .... 12
- Figura 2.** Huellas de DNA en gel de poliacrilamida de doble fase. La bandas polimórficas esta señaladas en la imagen con flechas. Las etiquetas en la imagen indican el primer utilizado. Los carriles de los extremos corresponden a marcado de peso molecular de 1 kb de Fermentas. .... 13
- Figura 3.** Agrupación por similitud y distancia genética entre los grupos por variaciones en sus perfiles de ADN con primer A15. .... 14
- Figura 4.** Agrupación por similitud y distancia genética entre los grupos por variaciones en sus perfiles de ADN con primer A17. .... 15
- Figura 5.** Dendrograma generado del análisis por agrupamiento con UPGMA de datos de siete iniciadores de RAPD..... 16

### CAPITULO II

#### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE UNA LINEA PURA DE CM-334 (*Capsicum annuum* L.) RESISTENTE A *Phytophthora capsici*

- Figura 1:** Coloración y pubescencia de hipocótilo; forma y color de hoja cotiledonal 34
- Figura 2:** Imágenes para descriptores de planta ..... 35
- Figura 3:** Imágenes para descriptores de inflorescencia..... 36
- Figura 4:** Imágenes para descriptores de fruto y semilla. .... 36

**Figura 5. Perfiles de DNA generados con RAPD. Cada conjunto de nueve carriles corresponde a perfiles por primer. Primer conjunto: primer A02; segundo conjunto: primer A08; tercer conjunto: primer A15. M: marcador de peso molecular 1 kb de Fermentas ..... 37**

**Figura 6. Perfiles de DNA generados con RAPD. Cada conjunto de nueve carriles corresponde a perfiles por primer. Primer conjunto: primer A17; segundo conjunto: primer B19; tercer conjunto: primer D04. M: marcador de peso molecular 1 kb de Fermentas ..... 38**

**Figura 7. Dendrograma de similitud de la línea de criollo de Morelos 334. .... 39**

### **CAPITULO III**

#### **MICROPROPAGACIÓN DEL CHILE CRIOLLO DE MORELOS 334 (*Capsicum annum* L.) Y USO POTENCIAL COMO PORTA INJERTO DE *C. pubescens* R & P**

**Figura 1. A: Injerto transversal mostrando cicatrización parcial; B: Injerto diagonal o de lengüeta; C: Injerto en medio MS mostrando oxidación en zona de unión y portainjerto; D: Necrosis de la región central del tallo del portainjerto CM-334; E: Injertos en medio AA+BA sin oxidación y mejor cicatrización; F: Injerto en medio AA con mayor desarrollo de raíces y buen prendimiento. .... 57**

# CAPITULO I

## VARIABILIDAD GENÉTICO MOLECULAR DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) CRIOLLO DE MORELOS 334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici*

### INTRODUCCION

México es considerado uno de los tres centros de domesticación del chile (*Capsicum annuum* L.). Esta hortaliza fue domesticada y mejorada mediante selección manual por las civilizaciones nativas que progresaron en el país. El cual dio como resultado una gran diversidad de tipos de chiles, ubicando a México como uno de los centros de mayor diversidad de esta especie. En la actualidad, el consumo de esta hortaliza es tan generalizado que se cultiva en todo el territorio nacional. La superficie dedicada para su producción en cada entidad federativa está en función del destino de la producción. En este sentido, la producción puede ser para el mercado local o de autoconsumo, pero cuando la producción es a escala comercial, las pérdidas por problemas de tipo fitosanitario son considerables. En campo, los patógenos que atacan a las plantaciones del cultivo del chile, bacterias, hongos, virus, nematodos y en menor proporción, los fitoplasmas. En México, es la marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici* una de las enfermedades que causa pérdida en promedio del 40% e incrementa los costos de producción por gastos en su control.

El chile criollo de Morelos 334, es considerado como fuente de resistencia universal a la marchitez de plantas de chile ocasionada por *Phytophthora capsici*. Es utilizado en diferentes países en programas de mejoramiento genético para el control de la marchitez. Sin embargo, en México no existen antecedentes de un estudio detallado de la variabilidad genética del CM-334 ni de líneas de chiles que haya sido generadas mediante el uso de este material. Para utilizarlo en un programa de mejoramiento, es necesario disponer de una línea pura, caracterizado mediante descriptores morfológicos y validados con marcadores de ADN. Disponer de una línea pura, no solo es útil en el mejoramiento genético molecular, sino también el mapeo de genes y para la identificación de patotipos y razas de

*Phytophthora capsici*. Con base a los antecedentes antes aclarados, se propone la siguiente hipótesis

El genotipo CM-334 está integrado por genotipos homocigotos y heterocigotos resistentes a *P. capsici* y sus progenies, producto de la recombinación y polinización cruzada, son segregantes evidenciándose individuos con diferentes niveles de variabilidad. La hipótesis alterna es que la población de CM-334 es una línea pura y no hay variación genético molecular. Para probar mi hipótesis. Se realizó esta investigación con los siguientes objetivos fueron:

Determinar la variabilidad genético molecular del criollo de Moleros 334 mediante comparación de perfiles de DNA generados con Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD).

Calcular la matriz de similitudo a parti de datos moleculares de genotipos que iintegran la población de CM-334 con el índice de similitus de Nei and Li dice y construcción de dendrogramas por el método de UPGMA.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

El género *Capsicum* (Familia: Solanaceae) tuvo su origen en América del Sur (Castañón-Nájera *et al.* 2008; Rodríguez *et al.*, 2008) Después de su domesticación, el chile se dispersó a Europa, el Mediterráneo y el Medio Oriente, hasta alcanzar Asia y África, lugares donde se ha cultivado ampliamente, convirtiéndose en centros secundarios de diversificación (Djian-Caporalino *et al.*, 2006). Los registros arqueológicos muestran que el chile ha estado presente en la dieta del ser humano desde hace más de 6100 años, y que fue domesticado desde hace 4000 años. Recientemente se ha incrementado el interés de los científicos en conservar la diversidad de chiles debido a su uso e importancia económica (Ortiz *et al.*, 2010).

El chile es uno de los productos agrícolas de mayor comercialización en el mundo, la producción mundial de chiles frescos y secos se concentra en Asia (India, China e Indonesia), en África (Etiopía) y América, siendo México el mayor productor de chile (FAOSTAT, 2011). México, como centro de domesticación cuenta con cinco especies

cultivadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. baccatum* var *pendulum*, *C. frutescens* (Morán *et al.*, 2004). El consumo de chile a nivel mundial ha aumentado debido a que se usa en la preparación de platillos mexicanos, mediterráneos y asiáticos, como condimento o colorante o como materia prima en la elaboración de otros productos (Djijan-Caporalino *et al.*, 2006), en el área farmacéutica (Bosland y Votava, 2000) y también tiene uso ornamental (Djijan-Caporalino *et al.*, 2006).

### **Diversidad genética y resistencia a *Phytophthora capsici*:**

El género *Capsicum* incluye un gran número de variedades con una gran diversidad de pungencia, colores y sabores. El género *Capsicum* comprende entre 25 y 30 especies (Baral y Bosland, 2002<sup>a</sup>; Castrejón-Nájera *et al.*, 2008), cinco de las cuales han sido domesticadas (Baral y Bosland, 2002a). Las especies domesticadas difieren en sus caracteres morfológicos y en su distribución geográfica (Baral y Bosland, 2002b). Actualmente es uno de los grupos de plantas que con alta demanda de cultivo. Dado que *Capsicum* se encuentra presente en todo el planeta, la diversidad genética y fenotípica es grande (Lefebvre *et al.*, 1995). Debido a su importancia económica, *Capsicum* es uno de los géneros sometidos a mejoramiento genético. El mejoramiento de cualquier cultivo requiere la elección de características agronómicas deseables, heredables para potenciar el aspecto económico (Mathew, 2006). La diferenciación de las diferentes variedades de *Capsicum* está fundamentada en caracteres morfológicos (González-Andres-2001), los principales caracteres de evaluación son atributos de las flores, semillas y frutos, rasgos que pueden no ser de mucha ayuda, dado que puede haber sobreposición u homogeneidad en factores fenotípicos compartidos (Baral y Bosland, 2002<sub>b</sub>). Los procesos de mejoramiento hasta ahora, han dado como resultado que los frutos sean de mayor tamaño, que sean más numerosos y que la pungencia sea altamente variable, aún entre líneas de la misma variedad de chiles.

Uno de los objetivos del mejoramiento de las especies de uso agrícola es encontrar variedades y/o genotipos resistentes a ciertos patógenos. El chile, es atacado por patógenos que ocasionan la pérdida de los cultivos siendo *Phytophthora capsici* Leo., responsable de entre el 70 y 80% de las pérdidas en la producción (González-Pérez *et al.* 2004, Silva-Rojas

*et al.*, 2009). *P. capsici* produce una enfermedad conocida como marchitez, la cual es una enfermedad policíclica que completa más de un ciclo de la enfermedad durante el ciclo de cultivo, la enfermedad es de rápida dispersión y causa pudrición de la raíz (Silva-Rojas *et al.* 2009).

El genotipo Criollo de Morelos 334 (CM-334) del chile serrano es altamente resistente a *P. capsici* y su resistencia se ha mantenido aun cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas y actualmente se le considera como el resistente universal a *P. capsici* (Glossier *et al.*, 2008). En las solanáceas la resistencia esta usualmente asociada con la reacción de hipersensibilidad (HR), una muerte celular rápida y localizada de las plantas infectadas como respuesta al ataque de patógenos. Muchos autores muestran que el HR es acompañado por la producción o liberación de moléculas de oxígeno reactivo, ácido salicílico, compuestos fenólicos u otros compuestos involucrados en señales extracelulares de las rutas de transducción. La activación de los genes de defensa, cambios estructurales (especialmente en pared celular) y la síntesis de fitoalexinas también han sido observados (Pegart *et al.* 2005). La reacción de hipersensibilidad también se ha observado en plantas atacadas por virus.

El mecanismo de defensa del CM-334 para inhibir el avance de *P. capsici* a través sus tejidos hasta ahora se ha explicado de la siguiente forma: de principio, los investigadores mencionan que la resistencia de las plantas de chile a *P. capsici*, probablemente se debe a la reacción de hipersensibilidad que ocurre en el sitio de contacto, donde la infección del oomiceto es detenida (Candela *et al.*, 1995). Los resultados de diversos trabajos sugieren que, las plantas responden al ataque del oomiceto mediante incremento en la producción de metabólicos como peroxidasas (Godínez-Vidal *et al.*, 2008), PAL (enzima fenilalanina amonio liasa. Candela *et al.*, 1995; Ezziyyani *et al.*, 2004), ácido jasmónico y salicílico (Ueeda *et al.*, 2006). PAL es una enzima reguladora en la ruta de los fenil-propanoides, a partir de la cual se sintetizan múltiples metabolitos secundarios incluyendo fenoles, algunos de los cuales participan en la lignificación de tejidos infectados mientras que otros poseen actividad antimicrobiana (Villar-Luna *et al.*, 2009). Un incremento en la actividad de PAL se ha asociado con la respuesta de hipersensibilidad en los genotipos de chile resistentes a *P. capsici* (Candela *et al.*, 1995;

Ezziyyani *et al.*, 2004; Villar-Luna *et al.*, 2009). Fernández-Herrera *et al.*, (2012), reportan que las platas de CM-334 responden al ataque de *P. capsici* con un incremento en los transcritos del gen *EAS* y en la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasas y peroxidasas. El gen *EAS* codifica para la síntesis de la enzima la 5-*epi*-aristolóqueno (Bohlmann *et al.*, 2002) la cual participa en la biosíntesis de capsidiol, fitoalexina que se acumula en los sitios de infección del oomiceto inhibiendo su avance (Candela *et al.*, 2000). En tanto que la  $\beta$ -1,3-glucanasas hidroliza la  $\beta$ , 1-3 glucano, compuesto que es el principal componente de la pared celular de *P. capsici* (Selitrennikoff, 2001). Las peroxidasas refuerzan la pared celular mediante deposición de polímeros de lignina y suberina, (Passardi *et al.*, 2005). De manera similar, Godínez-Vidal *et al.*, 2008 y López-Martínez *et al.*, 2011, encontraron incrementos en la actividad de las enzimas peroxidasas, fenilalanina amonioliasa (PAL) así como la concentración de fenoles solubles totales y ácido clorogénico en CM-334 como respuesta al ataque de *P. capsici*.

Como se mencionó anteriormente es de gran importancia generar variedades resistentes a *P. capsici*, y dado que las técnicas de mejoramiento genético tradicionales involucran un mayor gasto económico y producen resultados a largo plazo, es necesario buscar alternativas de mejoramiento rápidas y efectivas. El uso de marcadores moleculares como herramienta en el mejoramiento de *Capsicum* se ha incrementado en los últimos años (González-Andrés, 2001). El uso de marcadores moleculares no se ven influenciados por el crecimiento, clima, localización geográfica o proceso de cultivo (Known *et al.* 2003). El análisis de marcadores moleculares permite la identificación de caracteres polimórficos, heredables y en ocasiones de fácil detección (González-Andrés, 2001), entre los más usados se encuentran los de ligamiento molecular (Lefebvre *et al.* 1995), RAPD, RFLP, ASLP, ISSR, SSR, SPAR, CAPS y SCAR (Mathew, 2006). Estos marcadores actúan como herramientas para estudiar la diversidad genética, el análisis de ligamiento, el marcado de genes y el mapeo genómico. Estas son útiles para proteger la diversidad genética de las plantas por huellas de DNA y para eliminar la duplicación en el germoplasma (Mathew, 2006). A continuación se hará una breve descripción de los métodos moleculares más usados en el estudio de *Capsicum*.

a) Amplificación Aleatoria del DNA Polimorfico (RAPD por sus siglas en inglés: Random Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica involucra la amplificación del DNA genómico total usando un cebador aleatorio simple (usualmente de 10 pb) y la separación de los fragmentos amplificados en un gel (electroforesis). En promedio, cada cebador puede amplificar diversos loci en el genoma. Permite la diferenciación entre especies cercanamente relacionadas (Mathew, 2006). Los perfiles de DNA generados usando RAPD han sido usados en diversos estudios para detectar polimorfismos en *Capsicum* (Heras *et al.* 1996; Mathew, 2006), a partir de los resultados de estos autores, fue posible distinguir entre *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. annum*. Baral y Bosland (2002<sub>b</sub>) evaluaron la diversidad de las accesiones mexicanas de *Capsicum*. Los RAPD también ha sido capaz de caracterizar líneas híbridas de *Capsicum* (Mathew, 2006). Esta técnica es relativamente barata, reproducible, de fácil análisis, sin embargo puede presentar algunos inconvenientes metodológicos que pueden dificultar la obtención de polimorfismos (Baral y Bosland, 2002<sub>b</sub>). Sin embargo, algunos autores han cuestionado su reproducibilidad (Valadez-Moctezuma *et al.* 2004), y en algunos casos es incapaz de distinguir entre líneas cercanamente relacionadas o en líneas isogénicas (Mathew, 2006). Para solucionar este problema algunos autores han combinado los métodos RFLP y RAPD (RF-RAPD) en *Capsicum* para distinguir entre líneas cercanamente relacionadas (Yang y Park, 1997; Mathew, 2006).

b) Poliformismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) involucra la digestión de DNA genómico usando endonucleasas de restricción, a partir de lo cual se visualizan fragmentos que contienen secuencias homologas particulares. Usada para el análisis de huellas genéticas, la construcción de mapas de ligamiento y diferenciación de heterocigosidad debido a la diversidad alélica (Mathew, 2006).

c) Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) involucra la restricción de DNA y la ligación de adaptadores oligonucleoicos, la selección selectiva de sets de restricción y el análisis del gel de los fragmentos amplificados. Utilizado para evaluar polimorfismos, generar huellas de ADN y construir mapas de marcadores genéticos. Desventaja: se requiere el uso de sustancias radioactivas (Mathew, 2006).

d) Microsatelites: involucra la amplificación de tándems repetitivos en el DNA genómico. Altamente conservadas, estas secuencias repetidas (1-6 bp) son únicas para cada individuo. Los microsatelites son co-dominantes y presentan un alto polimorfismo incluso entre líneas isogénicas cercanas. Usados para estudios filogenéticos y el mapeo genético (Mathew, 2006).

e) Secuencias Polimórfica Amplificada y Cortada (CAPS por sus siglas en inglés Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), involucra la amplificación del ADN, por reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con un par de iniciadores específicos y el análisis por electroforesis de los amplificadores, después de la división con endonucleasas de restricción. Los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática y se migra en un gel de agarosa (Mathew, 2006). Las variaciones se detectan por presencia o ausencia de sitios de restricción, por lo que se pueden identificar cambios finos en zonas específicas. Este marcador es usado para el estudio de líneas de mejoramiento usando polimorfismos. En ocasiones los CAPS son usados en combinación con los AFLP, como es caso del trabajo reportado por Caranta *et al.*, (1999) quienes combinando estos métodos desarrollaron un protocolo para localizar el locus del gen Pvr4 en *Capsicum annum*.

El uso de marcadores moleculares, ha permitido a diversos investigadores explorar la relación *Capsicum-Phytophthora*, no solo para determinar los mecanismos de resistencia de *Capsicum* al oomiceto, sino también intentado determinar el tipo y número de genes responsables de la resistencia de CM-334 a *Phytophthora capsici*. Sin embargo aún no hay consenso en los resultados obtenidos. Por un lado, existen evidencias de que la resistencia es poligénica (Walker y Bonan, 1997; Bonnet *et al.*, 2007) y se sugiere que estos genes responden de manera independiente al ataque de *P. capsici* (Bonnet *et al.*, 2007). A su vez Sy *et al.*, (2005) sugieren la existencia de tres genes de resistencia que son responsables de la respuesta al ataque en diferentes regiones de la planta (raíz, tallos y hojas), y se sugiere que el efecto que cada gen tiene en una planta, está determinada por la susceptibilidad no solo de la planta, sino de la zona y modo de infección. Por otro lado, algunos autores han sugerido que la resistencia a *P. capsici* es de carácter dominante (Egea- Gilabert *et al.*, 2008), pero su heredabilidad es compleja debido a su naturaleza poligénica, y a la probable

existencia de efectos epistáticos (Minamiyama *et al.*, 2007). Por ello no se han generado cultivares de chile comerciales con una adecuada resistencia a este patógeno. El CM-334 también muestra altos niveles de resistencia a tres nematodos parásitos de la raíz (Pegard *et al.* 2005).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Obtención de platas de CM-334**

Las semillas de CM-334 se desinfectaron con hipoclorito de sodio libre a 1.5% volumen/volumen (CLORALEX® El Rendidor®, México) por un minuto 30 segundos, después lavadas con agua destilada estéril hasta no percibir el olor a cloro. Fueron colocadas en cajas de plástico (15x20x5 cm) con toallas de papel estéril húmedas y mantenidas en oscuridad a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  en una incubadora (Incubator C800, YAMATO®, Japón). A los 11 días, 200 plántulas fueron sembradas individualmente en vasos de plásticos No.0 (Envases Cuevas, S. A. de C.V., México) con arena de río estéril como sustrato, colocadas en cámara bioclimáticas con 16 hr luz y 8 de oscuridad. Cuando presentaron de 6 a 8 hojas verdaderas, fueron trasplantadas en bolsas para maceta de 20x25 cm con una mezcla (2:1) de Peat moss mezclado con tezontle y establecidas en invernadero. Se regaron cada tercer día y fertilizaron cada semana con una solución de esNitrofoska® azul especial COMPO® (12-12-17-2 mg Mg)  $3\text{ g}^{-\text{L}}$

### **Extracción DNA.**

Para la extracción de DNA, se pesó en promedio 500 mg de hojas jóvenes por planta, cada muestra fue pulverizada en mortero con nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ) hasta obtener un polvo fino e inmediatamente trasferido a tubos Eppendorf de 2 ml, se le agregó 750  $\mu\text{L}$  de buffer extracción [CTAB A 2.5 % peso/volumen, 1.4 mM de NaCL, 20 mM de EDTA, 100 mM de TRIS·HCL, pH 8.0 y 0.2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (adicionado al momento de la extracción)]. Se incubaron en baño maría (Rotary Vacuum Evaporator NE-1S, WHEATON®, Japón) por una hora agitándolos cada 10 minutos en un agitador tipo vórtex Modelo Apollo (CLP Molecular Biology, USA). Se les agregó 750  $\mu\text{L}$  de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 agitándolos por 10 min. Se centrifugó por 10 min a 8500g en una

centrifuga modelo EVA 21(Hettich Zentrifugen, Alemania), la fase superior se pasó a tubos Eppendorf nuevos de 1.5 ml y se agregó un volumen de 2-propanol, se mezcló por inversión de tubos. Se incubaron por una hora a -20°C, se centrifugaron por 10 min a 8500 g, se decantó la fase líquida, para lavar la pastilla formada, se agregó a cada tubo un ml de etanol a 70%, acción que se repitió 2 veces. Para secar el pellet de DNA, los tubos se colocaron invertidos sobre toallas de papel (Sanitas®). El DNA se resuspendió en 200 µL de agua libre de nucleasas.

### **Cuantificación e integridad del DNA**

Para determinar el rendimiento, pureza e integridad del DNA, se utilizó un espectrofotómetro modelo ND-1000 (NanoDrop®, USA) y electroforesis en gel de agarosa a 1.2 % por 60 minutos a 90V, elaborado y corrido con buffer TAE 1X. Por pozo y muestra, se depositó 4 µL de DNA concentrado mezclado con 2 µL de buffer de carga tipo III (Molecular Cloning, 1989). El gel se fotodocumentó en un fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Italia) con el software Quantity One-4.1.1.

### **Perfiles de DNA mediante RAPD**

Para generar los perfiles tipo RAPD, del DNA concentrado de cada muestra se realizaron diluciones a 20 ng<sup>-µL</sup>. La concentración de los elementos de PCR fue Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP's 0.2 mM; por reacción 20 pMol de oligonucleótidos, 1.5 U de TaqDNA polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Promega. USA), 100 ng de DNA y agua libre de nucleasas hasta ajustar un volumen final de 25 µL. El programa de termociclaje fue 94°C 4" para la predesnaturalización, 40 ciclos (94°C 40 s de desnaturalización, 44°C 40 s de alineamiento y 72°C 1.5 min de extensión) y extensión final de 72°C 10 min en un termociclador TC 512 (TECHNE, UK). Los iniciadores RAPD de la serie A, B, y D que se utilizaron para establecer el nivel de heterogeneidad genética del genotipo de Chile (*Capsicum annuum* L) Criollo de Morelos 334 se enlistan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de chile CM-334.

Clave	Secuencia	Temperatura de alineamiento
A02	(5'→3'): tgc cga gct g	44°C
A08	(5'→3'): gtg acg tag g	44°C
A15	(5'→3'): ttc cga acc c	44°C
A17	(5'→3'): gac cgc ttg t	44°C
B14	(5'→3'): tcc gct ctg g	44°C
B19	(5'→3'): acc ccc gaa g	44°C
D04	(5'→3'): tct ggt gag g	44°C

### Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Para visualizar los perfiles genético molecular obtenidos con amplificación aleatoria del DNA polimórfico, los productos de PCR se separaron en gel de poliacrilamida (29:1 de acrilamida-bisacrilamida) de dos fases, la primera, staking gel (gel concentrador) fue de 5% y el running gel (gel separador) de 16%. La electroforesis se hizo en una cámara vertical MGV-216-33 (C.B.S. Scientific Company. Inc. U.S.A) usando buffer de corrida TBE 1X. De cada muestra, se cargó 6 µL mezclado con 1.6 µL de buffer de carga SGV 5X. El tiempo de corrida fue de seis horas a 200V. La tinción y revelado de las huellas de DNA se hizo con nitrato de plata y formaldehido. Proceso en que gel fue sumergido por 15 min en una solución de fijación, después en solución de nitrato de plata a 0.1% por 5 min, se enjuagó con agua del grifo por 5-10 s y finalmente se dejó en solución de revelado (hidróxido de sodio más formaldehido a 3% y 0.1 % respectivamente) hasta que todas las bandas del marcador de peso molecular fueron visibles. Durante, el revelado, se utilizó un agitador automatizado y una campana de extracción. El gel se fotodocumento con una cámara digital Canon PowerShot A640 (Canon. Inc. China).

### Análisis estadístico de datos moleculares

Los perfiles de DNA de las plantas fueron decodificados en un matriz de datos binario de (0 y 1), uno en los individuos que presentaron bandas de igual longitud y cero en los que no se observaron. Esto se hizo con cada iniciador, las tablas de datos binarios de todos los

iniciadores se conjuntaron en una sola y se analizaron con el software NTSYSpc ver. 2.21c (Rohlf, 2009). Para determinar el nivel de heterogeneidad genética, la distancia genética se calculó con el coeficiente de Nei and Li (1979) ya que considera la usencia de una banda como un resultado de cambios en la recombinación genética. La agrupación se hizo por el método de UPGMA y el cladograma se dibujó con SHAN.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Plantas de CM-334**

De las 200 plantas, 120 se conservaron durante todo el estudio. Se extrajo el DNA de cada una y generó huellas moleculares de 96 individuos. Se determinó la variabilidad genética del Criollo de Morelos 334. Los genotípicos identificados se mantuvieron en invernadero hasta la obtención de semilla.

### **Calidad, rendimiento e Integridad del DNA obtenido**

El DNA se cuantificó en la relación 260/280 y 260/230 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico simple, Cuadro 2. Los valores de rendimiento ( $762.3 \text{ ng}^{-\mu\text{L}}$  en promedio) y pureza del DNA (2.07 tanto en la relación 260/280 como 260/230 nm de longitud) y los valores del Coeficiente de Variación sugieren que el método utilizado fue eficiente y sus resultados reproducibles. Eluciones puras de ácidos nucleicos tiene valores de absorbancia  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  de 1.8 y 2.0, pero en presencia de contaminantes como proteínas o fenoles, estos serán menores (Sambrook *et al.*, 1989). Se ha aceptado que la absorbancia a 230 nm es indicador de otros contaminantes, por lo tanto, frecuentemente se ha calculado la relación 260/230, el cual comúnmente varia de 2.0 a 2.2 para un DNA puro, pero si son menores, pueden indicar problemas asociados al tipo de muestra, al procedimiento de extracción, presencia de carbohidratos, residuos fenólicos, EDTA, sales de buffers y residuos de péptidos (Wilfinger *et al.*, 1997)

Cuadro 2. Análisis de varianza de lecturas de pureza y concentración de DNA de plantas de chile CM-334.

	ng <sup>μL</sup> de DNA	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>
Media	762.3	2.07	2.07
Varianza	149136.0	0.01	0.03
Desviación Estándar	386.2	0.08	0.17
Coefficiente de variación	0.5	0.04	0.08
Mediana	677.8	2.09	2.11
Moda	---	2.14	2.19
Valor mínimo	147.45	1.87	1.34
Valor máximo	2191.02	2.21	2.40

### PERFILES RAPD-PCR

Los perfiles de DNA de las plantas de chile de CM-334 se muestran en las figuras 1 y 2. Para cada primer se hizo una matriz de datos binario (1 y 0); presencia y ausencia de banda, con la cual se calculó la distancia genética y estableció el nivel de similitud entre los individuos de la población evaluada.

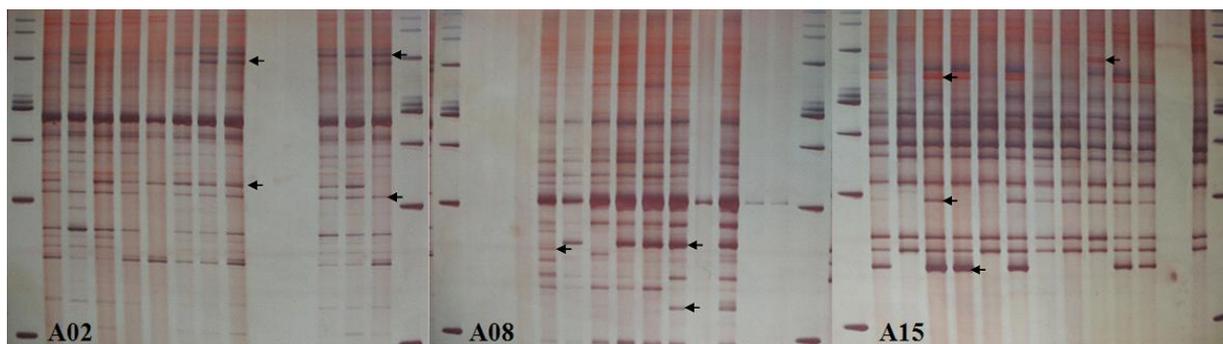


Figura 1. Huellas de DNA en gel de poliacrilamida de doble fase. La bandas polimórficas están señaladas en la imagen con flechas. Las etiquetas en la imagen indican el primer utilizado. Carriles extremos corresponden a marcado de preso molecular de 1 kb de Fermentas.

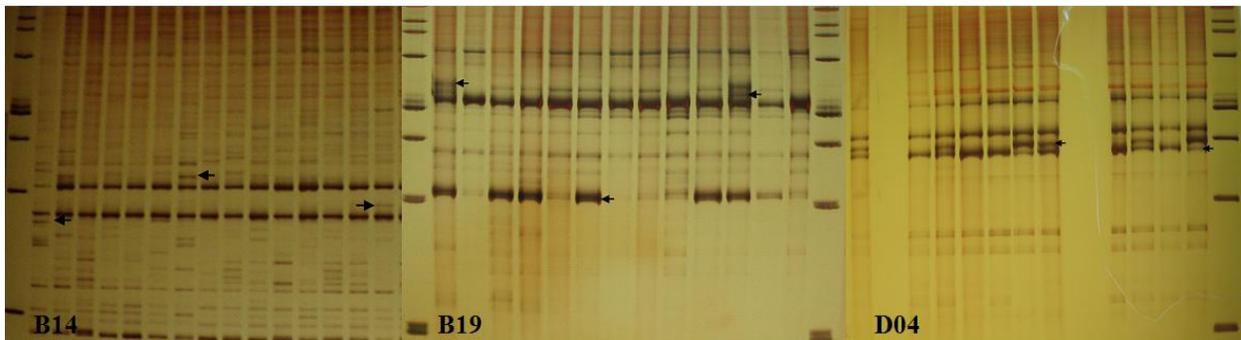


Figura 2. Huellas de DNA en gel de poliacrilamida de doble fase. Las bandas polimórficas esta señaladas en la imagen con flechas. Las etiquetas en la imagen indican el primer utilizado. Los carriles de los extremos corresponden a marcado de preso molecular de 1 kb de Fermentas.

Con los siete primer utilizados para generar las huella de DNA de una población de 95 plantas del criollo de Morelos 334, se amplificaron un total 98 bandas, de la cuales 73 fueron polimórficas y 25 monomórficas Cuadro 3. Fue el primer A15 el que más polimorfismo proporcionó y el A17 el que mayor número bandas amplificó.

Cuadro 3. Numero de bandas amplificadas por iniciadores aleatorios en una población de 96 plantas de CM-334.

Iniciador	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	Total de bandas
A02	11	2	13
A08	5	3	8
A15	15	2	17
A17	13	6	19
B14	8	5	13
B19	12	3	15
D04	9	4	13
<b>TOTAL</b>	<b>73</b>	<b>25</b>	<b>98</b>

El análisis de similitud de los datos moleculares del iniciador que amplificó un mayor número de bandas polimórficas (A15), permitió ubicar tres grupos bien definidos a una distancia de 0.90 según coeficiente de Nei y Li. (Figura 3). En el grupo A se encontraron el mayor número de plantas (72), el grupo B con 4 plantas y el grupo con 14 individuos. No obstante, se identificaron 2 plantas genéticamente muy alegas de los tres grupos (3 y 15).

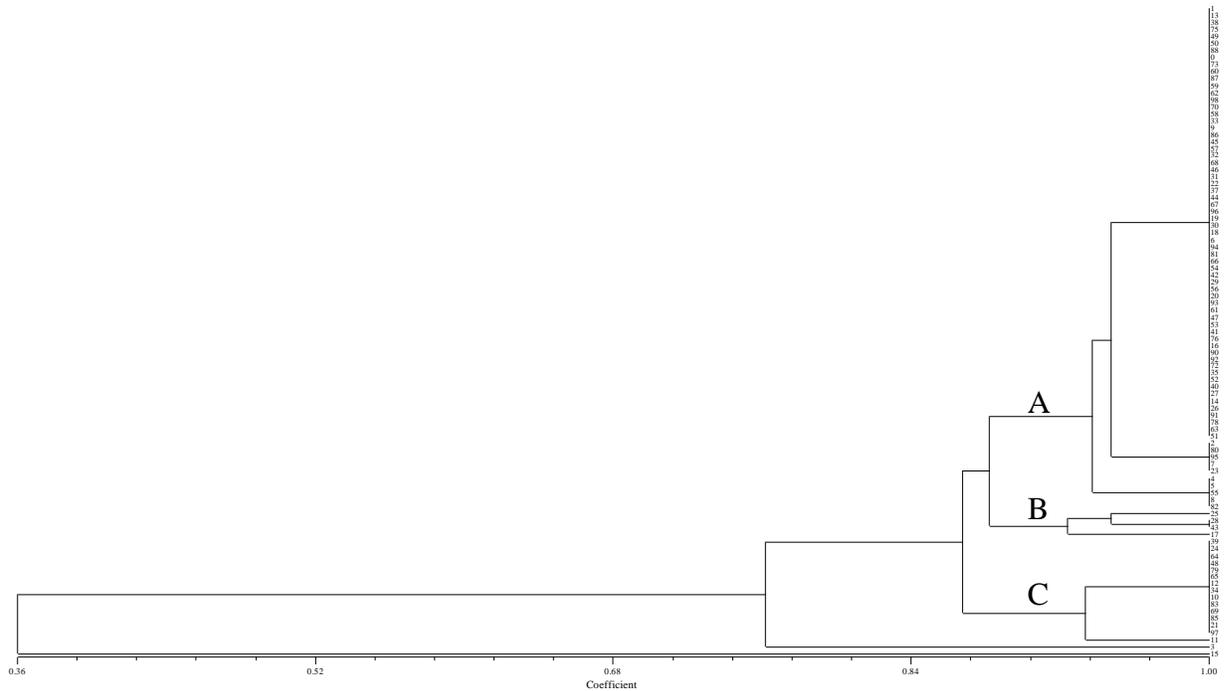


Figura 3. Agrupación por similitud y distancia genética entre los grupos por variaciones en sus perfiles de ADN con primer A15.

Con el iniciador A17, con el que se obtuvo menos polimorfismos, a la misma distancia genética que el anterior, se define un solo grupo (A) con 90 plantas, al cual se le separa 2 plantas (91 y 15).

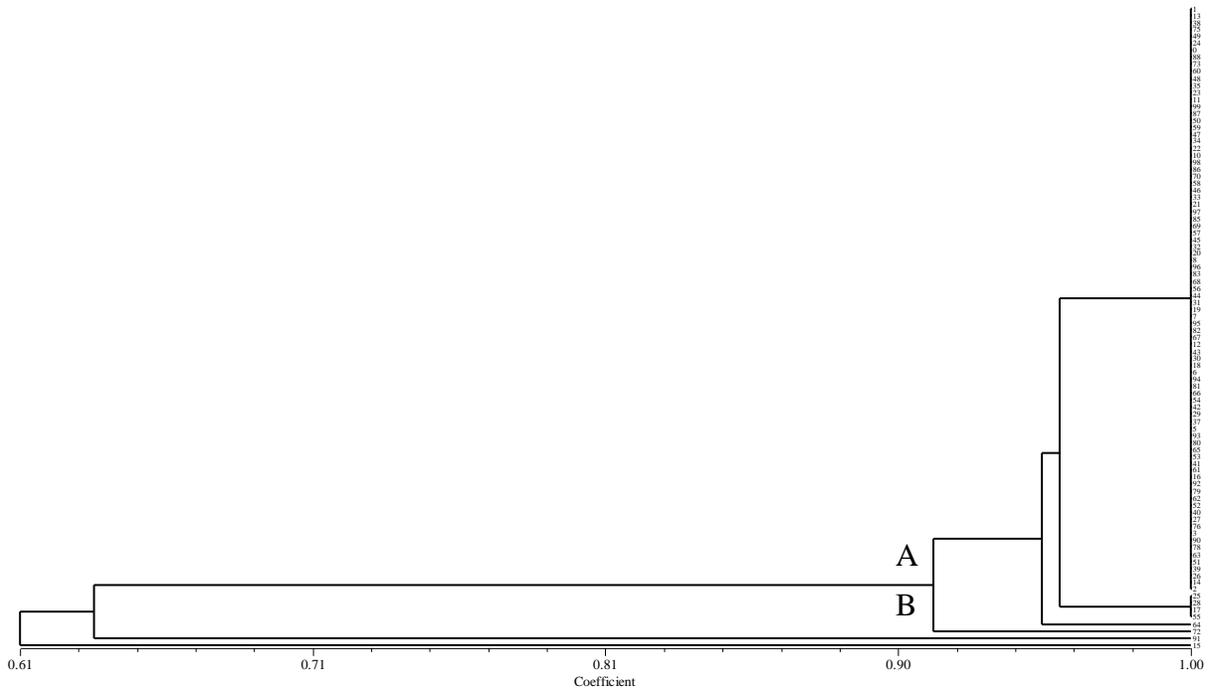


Figura 4. Agrupación por similitud y distancia genética entre los grupos por variaciones en sus perfiles de ADN con primer A17.

Los datos binarios de los siete primers fueron utilizados en conjunto para calcular la matriz de similitud con el índice de Nei and Li (1979). Con la matriz de similitud se hizo el análisis de agrupamiento para generar el dendrograma correspondiente (Figura 5). Los resultados muestran una población de CM-334 heterogénea. Con un índice de 0.9, se observa un grupo principal y 5 plantas que genético molecular es diferente del grupo principal. Haber determinado una población heterogénea a partir de un índice de similitud alto y con pocos iniciadores aleatorios, es indicativo de que éste genotipo carece de una selección dirigida. No es una línea ni una variedad de Chile. El polimorfismo asociada a polinización cruzada o dispersión de semillas con lo indican Bhadragoudar y Patil (2011), tampoco se aplica en este material, ya que se ha multiplicado bajo condiciones controladas. No obstante, a partir del índice de similitud 1, se ubicaron dos grupos, cuya distancia genética entre sus integrantes es 0. Es decir, que esta agrupación está integrado por individuos genéticamente homogéneos, que se puede seleccionar como una línea pura o variedad.

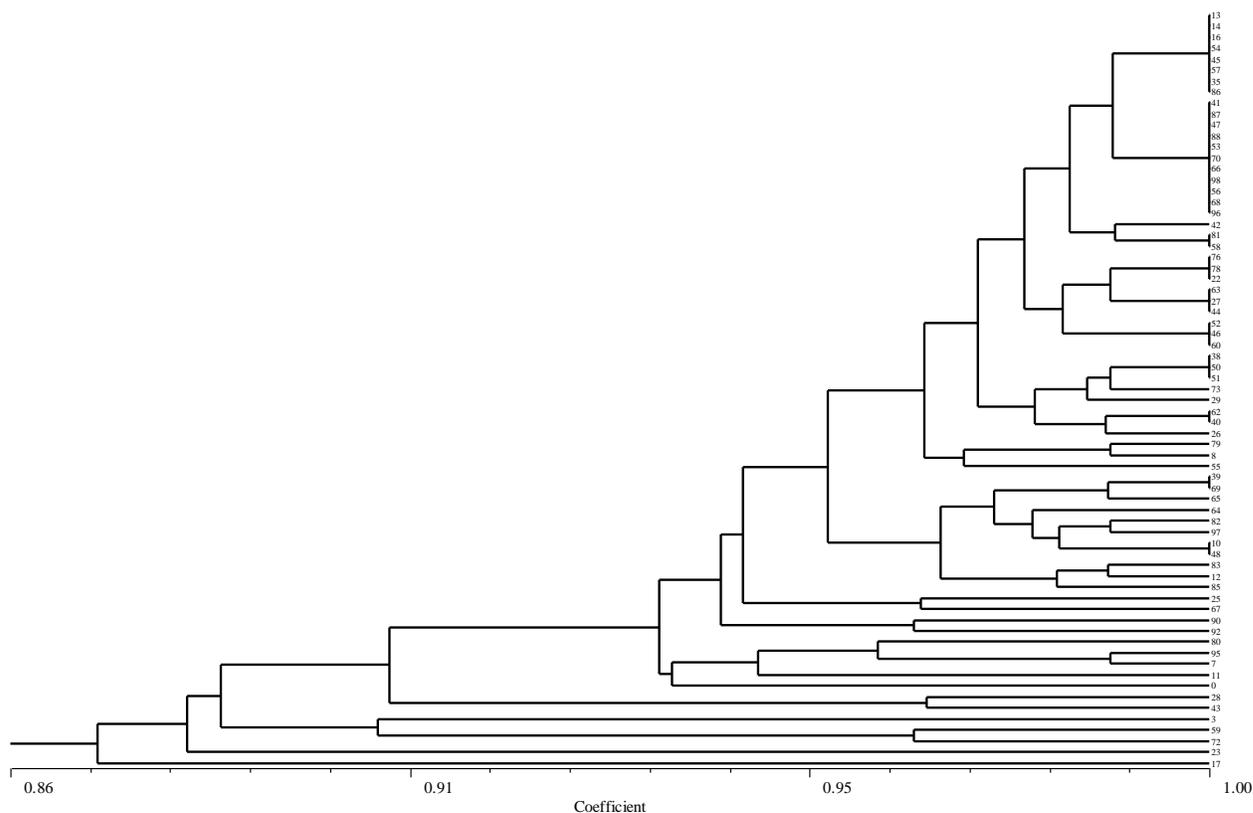


Figura 5. Dendrograma generado del análisis por agrupamiento con UPGMA de datos de siete iniciadores de RAPD.

Se ha cuestionado la confiabilidad de la técnica RAPD por su poca reproducibilidad, sin embargo, su utilidad aun es vigente. Se ha utilizado para mapeo genético de plantas del genero *Capsicum* en la búsqueda de genes de resistencia a virus (Mathew, 2006; Gonzales et al., 2011), en estudios de relación genética entre especies del género *Capsicum* (Sanatombi *et al.*, 2010). En el rastreo del gen *Rf* asociado a la pungencia en líneas de *C. annum* L (Sanjeet, et al 2007). En el estudio de la diversidad genética para su uso programas de mejoramiento genético (Bhadragoudar y Patil, 2011).

Los RAPD identifican polimorfismo que pueden ayudar a diferenciar poblaciones entre líneas o accesiones de material para utilizarlos en el mejoramiento genético de plantas. Los RAPD son simples, rápidos y tienen un bajo costo y pueden ofrecer

criterios de clasificación robustos y útiles en la separación y sistemática de especies (Bhadragoudar y Patil, 2011). Aun cuando su reproducibilidad entre laboratorios es cuestionado por causa de factores variables, como la temperatura durante el termociclaje por diferentes marcas de termocicladores, marca y concentración de reactivos y la calidad del DNA (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2005). No obstante, representa una opción económica y viable para estimar la variación genética de accesiones que son de interés en el mejoramiento genético de plantas.

## CONCLUSIONES

Mediante el cálculo de la matriz de similitud con el Índice de Nei and Li (1979) de datos moleculares de la Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico de 96 plantas de Chile de CM-334, se determinó que la población no es genéticamente homogénea y por lo tanto, si se desea usarlo en un programa de mejoramiento genético, es necesario desarrollar una línea pura, genéticamente homogénea, estable y resistente al ataque de *Phytophthora capsici*.

## LITERATURA CITADA

- Baral, J. B. and P. W. Bosland. 2002a.** An updated synthesis of the *Capsicum* genus. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 21: 11- 21.
- Baral, J., P. and W. Bosland. 2002b.** Genetic diversity of a *Capsicum* germplasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Journal of American Society of Horticulture Science.* 127: 316 – 324.
- Bohlmann, J., E. J. Stauber, B. Krock, N. J. Oldham, J. Gershenzon, and I. T. Baldwin. 2002.** Gene expression of 5-epi-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *Nicotiana sylvestris*. *Phytochemistry* 60:109-116.
- Bonnet, J., S. Danan, C. Boudet, L. Barchi, A.-M. Sage-Palloix, B. Caromel, A. Palloix and V. Lefebvre. 2007.** Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 115: 253 – 264

- Boslan P-W and E-J Votava. 2000.** Peppers: vegetable a spice *Capsicum*. Crop Production Science in Horticulture 12. CABI Publishing.
- Candela, M. E, M. D. Alcázar, A. Espín, C. Egea and L. Almela. 1995.** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 44: 116 - 123.
- Candela, M. E., C. Egea, M. D. García-Pérez, J. Costa, and M. Candela. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. Acta Horticulturae 522:79-86.
- Caranta, C., A. Thabuis and A. Palloix. 1999.** Development of a CAPS marker for the Pvr4 locus: a tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. Genome 42: 1111–1116.
- 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. Phytón (Buenos Aires) 77: 189 – 2002.
- Djian-Caporalino, C., V. Lefebvre, A. M. Sage-Daubèze, and A. Palloix. 2006.** *Capsicum*. En: Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. Vol. 3. Vegetable Crops, R. J. Singh (ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. Pp 185 – 243.
- Egea-Gilabert, C., G. Bilotti, M. E. Requena, M. Ezziyyani, J. M. Vivo Molina, and M. E. Candela. 2008.** Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. Biologia Plantarum 52: 105-109.
- Ezziyyani, M., C. Pérez, M. E. Requena, L. Rubio and M. E. Candela. 2004.** Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26; 69 -78.
- FAOSTAT. 2011.** Agricultural production. <http://www.faostat.fao.org>
- Fernández-Herrera, E., R I. Rojas-Martínez, O Gómez-Rodríguez, L Guevara-Olvera, M. E. Rivas-Dávila, E Valadez-Moctezuma and E Zavaleta-Mejia. 2012.** Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile cm-334 inoculado con *Phytophthora capsici*. Interciencia 37: 370-376.
- Glossier, B-R., E-A. Ogundiwi, G-S. Sidhu and D-R. Sischo. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica 162:23-30.

- Godínez-Vidal, D., M Rocha-Sosa, E. B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. European Journal of Plant Pathology 120: 299–303.
- González, I., Y. Arias, M. Quiñones, I. Miranda, Y. Rodríguez, B. Peteira. 2011.** Variabilidad molecular de genotipos de pimiento (*Capsicum annum* L.) del programa de mejoramiento genético para la resistencia a PVY. Revista Protección Vegetal. 26: 69-72
- González-Andrés, F. 2001.** Caracterización de los recursos fitogenéticos. En Conservación y Caracterización de Recurso Fitogenéticos. F. González-Andrés y J. M. Pita (eds). Publicaciones INEA. Valladolid, España, pp. 189 – 217.
- González-Pérez, E., M. Yáñez-Morales, V. Santiago-Santiago and A. Montero-Pineda. 2004.** Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Agrocienca 38: 653 – 661.
- Heras, V. F. L., J. M. C. Jiménez and F. R. Vico. 1999.** RAPD fingerprinting of pepper (*Capsicum annum* L.) breeding lines. *Capsicum Eggplant News* 15: 37 – 40.
- Known, Y. S., K. M. Kim, D. H. Kim, M. Y. Eun and J. K. Sohn. 2003.** Marker-assisted introgression of quantitative trait loci associated with plant regeneration ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Molecules and Cells* 14: 24 – 28.
- 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.
- López-Martínez, N., M. T. Colinas-León, C. B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel. M. Biesaga and E. Zavaleta-Mejía. 2011.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* (DOI 10.1007/s11104-010-0553-5).
- Mathew, D. 2006.** Molecular markers in improvement of *Capsicum* spp- a review. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 15(1): 1 – 13.

- Minamiyama, Y., M. Tsuru, T. Kubo, and M. Hirai. 2007.** QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breeding Sci.* 57: 129-134.
- Morán-Bañuelos, S. H., V. H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres, E. Zavaleta-Mejia. 2010.** Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del Sur de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 21 - 26.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76: 5269-5273
- Ortiz, R., F. Delgado de la Flor, G. Alvarado, J. Crossa. 2010.** Classifying vegetable genetic resources – A case study with domesticated *Capsicum* spp. *Scientia Horticulturae* 126: 186 – 191.
- Passardi, F., C. Cosio, C. Penel, and C. Dunand. 2005.** Peroxidases have more functions than army knife. *Plant Cell Reports* 24:255-265.
- Pegard A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad and C. Diian-Caporalino. 2005.** Historical characterization to different root-knot nematode species related to phenolic accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology* 95: 158 – 165.
- Rodríguez, Y., T. Depestre and O. Gómez. 2008.** Eficiencia de la selección en líneas de pimiento (*Capsicum annum*) provenientes de cuatro sub-poblaciones, en caracteres de interés productivo. *Ciencia e Investigación Agraria* 35(1). 34 – 49.
- Rohlf, F. J. 2009.** NTSYSpc: numerical taxonomy system. ver. 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1531 p.
- Sanatombi, K., S. Sen-Mandi, G.J. Sharma. 2010.** DNA profiling of *Capsicum* landraces of Manipur. *Scientia Horticulturae* 124: 405–408
- Sanjeet Kumar, S. V. Singh, M. Singh, S. Rai, S. Kumar, S. Kumar R, M. Rai. 2007.** Genetics and distribution of fertility restoration associated RAPD markers in inbreds of pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae* 111: 197–202

- Selitrennikoff, P. C. 2001.** Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2883-2894.
- Silva-Rojas, H. V., S. P. Fernández-Pavia, C. Góngora-Canul, B. C. Macías-López and G. D. Ávila-Quezada. 2009.** Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e Identificación del agente causal. *Revista Mexicana de Fitopatología* 134: 1 – 14.
- Sy, O. and P. W. Bosland. 2005.** Inheritance of *Phytophthora* stem blight resistance as compared to *Phytophthora* foliar blight resistance in *Capsicum annuum* L. *Journal of American Society of Horticulture Science* 130: 75 - 78.
- Uueda, M., M. Kubota and K. Nishi. 2006.** Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 149 - 155.
- Valadez-Moctezuma, E., G. Kahl, A. Rubluo-Islas and R. Arreguín-Espinosa. 2004.** Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPnr. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11: 351 – 356.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R. I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A. M. Hernández-Anguiano and E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje en el chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39: 143 - 155.
- Walker, S. J. and P. W. Bosland. 1999.** Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *Journal of American Society of Horticulture Science* 124: 14 – 18.
- Wilfinger, W. W., K. Mackey and P. Chomczynski. 1997.** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22:474-481.
- Yang, T. and H. Park. 1997.** Increase of polymorphism by using restriction fragment random amplified polymorphic DNA 8 (RF-RAPD) in *Capsicum annuum* L. *Journal of Korean Society of Horticulture Science* 38: 688 – 692.

## CAPITULO II

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE UNA LINEA PURA DE CM-334 (*Capsicum annuum* L.) RESISTENTE A *Phytophthora capsici*

#### RESUMEN

Se realizó la caracterización morfológica y molecular de una población de chile (*Capsicum annuum* L) Criollo de Morelos 334 (CM-334). El objetivo fue demostrar que la población seleccionada es genéticamente homogénea mediante Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfica (RAPD) apoyados con datos de descriptores morfológicos del IPGRI. Se utilizaron siete iniciadores aleatorios para generar los perfiles de ADN de 26 individuos. Los productos de PCR, se separaron en gel de poliacrilamida de doble fase. El análisis estadístico de la matriz de datos binarios de los perfiles demostró que la población es genéticamente homogénea con un nivel de similitud del 100% entre los 26 individuos que incluyeron para la comparación de perfil de ADN. De los cuales, ninguna planta mostró síntomas de marchites después de ser inoculadas con  $30 \times 10^5$  zoosporas de *P. capsici*. Estos resultados sugieren que el método de selección fue apropiado para obtener una “línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a *Phytophthora capsici*”. La cual se caracteriza por ser planta anual, con tallos de color morado oscuro a los 30 días de emergida las plántulas. Con una altura de 89 cm y hábito de crecimiento erecto. A partir de la etapa de floración, las plantas presentan una flor por axila, el color de la corola es blanco y el de las anteras es morado, sin esterilidad masculina. Los frutos son de color negro antes de la madurez y rojos en estado maduro, de forma triangular, con 39 mm de longitud por 14 mm ancho. Los frutos pesan en promedio 3 g, sin presentar un cuello en su base y de epidermis liso. Las semillas son color amarillo paja, con 42 semillas en promedio por fruto.

**Palabras claves:** *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, distinta, estabilidad, homogeneidad, variedad.

## INTRODUCCION

En México existen más de 40 variedades de chiles, que son utilizados en una gran diversidad de platillos típicos y tradicionales representativos de cada estado de la república Mexicana. La variedad de sabores e ingredientes, por el uso de diferentes chiles, favorece el desarrollo de una gastronomía bien definida, exótica e incitante, la cual, a pesar de la influencia extranjera, aún conserva su particularidad debida a la variedad de formas y maneras en que en nuestro país se consume el chile (López y Castro, 2006). Se han hecho investigaciones en torno a su caracterización morfológica para establecer las relaciones de parentesco entre ellos. Estos han sido para tener conocimiento de la diversidad de especies del género *Capsicum* (Hernández-Verdugo, *et al.*, 2012). Sin embargo, son pocas las investigaciones enfocadas a generar datos más detallados con respecto a características agronómico de uso inmediato (Martínez-Sánchez *et al.*, 2010). Además, aun no existe los ordenamientos legales adecuados que regulen la protección de la diversidad genética de los materiales propios que han generado los productores, tal es el caso de frijol amarillo (*Phaseolus vulgaris*) por el cual, en el 2001, la empresa estadounidense Pod-Ners, L.L.C. demandó a los exportadores Mexicanos por vender estos frijoles alegando que violaban la patente que había obtenido del frijol, cuando estos materiales los había adquirido en años anteriores en México (Massieu y Chapela, 2002). Limitaciones que son aprovechadas por las empresas transnacionales para adueñarse del material genético que utilizan en sus programas de mejoramiento genético, poniéndolo a disposición de los grandes productores, semillas de variedades de alto rendimiento, resistentes a factores bióticos y abióticos (Tarrío *et al.*, 2004).

Por otro lado, también se ha presentado casos en que los investigadores comparten material vegetal con características agronómicas prometedoras en el mejoramiento genético de plantas cultivadas. Tal es el caso del chile, cultivo que es susceptible al ataque de *Phytophthora capsici*, causante de la marchitez y responsable de cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial. Desde el descubrimiento del agente causal en 1922, fueron varias las investigaciones que se realizaron entorno a la búsqueda de genotipos resistentes. En la actualidad, a nivel mundial el genotipo más resistente es un material de origen Mexicano, conocido como Criollo de Morelos 334 identificado de un total de 19 genotipos por Redondo en 1975 y 1979, año en que este investigador lo dio a conocer. Desde ese año

hasta la actualidad, se le ha utilizado en diferentes estudios, como fuente de resistencia a *P. capsici*, en USA, Francia, China, Corea, Japón y España. Países en los que los investigadores se han enfocados en comprender los mecanismos de defensa y descubrir el número de genes responsable de su resistencia. Desde que este material se tiene disponible en ciencias agrícolas, no se ha hecho trabajo alguno, en México, con intenciones de proteger dicho material o establecer convenios con los organismos que lo usan en sus programas de mejoramiento. Esto quizás se deba a que es de dominio público y por lo tanto enajenado. De ahí la necesidad de contar con la descripción morfológica y molecular de este valioso material genético e incluso seleccionar genotipos que proporcionen uniformidad fenotípica y genotípica con fines de tener respuestas consistentes en los estudios de resistencia a *P. capsici* y lograr su registro ante el SNICS como una variedad homogénea, distinta y estable.

### **Objetivo**

Obtener una línea pura del Criollo de Morelos (CM) 334 resistente a *P. capsici* para su registro ante el SNICS.

Evaluar la resistencia de la línea pura del CM33 mediante marcadores de ADN con RAPDS y demostrar que es distinta de la población original, que es estable y genéticamente homogénea.

### **REVISION DE LITERATURA**

El chile (*Capsicum annum* L.) Criollo de Morelos 334 (CM-334) fue dado a conocer por Redondo (1979) como el más resistente al ataque de *Phytophthora capsici* Leon. Este material y otros cinco fueron identificados como los más resistentes al oomiceto de una colecta de 19 materiales criollos, nativos del estado de Morelos colectados en 1974 y 1975. La evaluación de estos se hizo en la década de los 70's en campo y en invernadero del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) ahora Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío,

Celaya, Guanajuato. Dicho material genético fue incluido por Djian-Coporalino *et al.* (1999) en sus evaluaciones para la búsqueda de genotipos con fuente de resistencia a nematodos agalladores, reportaron que CM-334 fue resistente a *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*. Resistencia estable contra *Meloidogyne incognita* al mantener las plantas a 32 y 42°C (por 5-6 horas) durante 21 días.

En México, el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (2012) tiene inscrito 24 variedades de chile, 13 de *Capsicum annuum* L (Mantenedores: INIFAP) y 11 de *Capsicum chinense* Jacq (Mantenedores: 3 INIFAP y 8 por el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán A. C.). Pero de acuerdo a la Gaceta Oficial de los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales (2012), de 1996 a 2012, recibió 51 solicitudes de obtentor de variedades de chile: 38 de *C. annuum* L (13 de INIFAP, 17 de Seminis Vegetable Seed, Inc, 5 de Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel, B.V. y 3 de SVS Mexicana S. A. de C.V.), 10 de *Capsicum chinense* Jacq (2 de INIFAP y 8 de Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.) y una de *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. (Universidad Autónoma Chapingo). Es decir, en ninguna de esas solicitudes y catálogo aparece el CM334 resistente a *P. capsici*, no obstante que es material genético de gran valor para programas de fitomejoramiento en *Capsicum*.

Estadísticamente, se ha presentado más solicitudes de título de obtentor para variedades de maíz, rosa, fresa y algodón, en tanto que el chile (*C. annuum* L.) ocupa el noveno lugar, siendo los principales solicitantes el INIFAP, Pioneer Hi-Bred International, Inc., Semillas y Agroproductos Monsanto, S. A. de C.V., Driscoll Strawberry Associates, Inc. y Seminis Vegetable Seeds, Inc., en tanto que instituciones de enseñanza e investigación, la posición más cercana lo ocupa la Universidad Autónoma Chapingo en el onceavo lugar. Los primeros cinco países en tramitar este documento son Estado Unidos, Holanda, Francia, Alemania e Italia. México en asociación con Estados Unidos, ocupa el lugar número 20 (SAGARPA-SNICS, 2012).

De acuerdo a la Ley Federal de Variedades Vegetales, el título de obtentor es un documento expido por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el que se reconoce y ampara el derecho de una variedad vegetal, nueva, distinta, estable y homogénea. Es la ley antes mencionada en la que se establecen las bases y procedimientos

para la protección de los derechos de obtentores de variedades vegetales y es la SAGARPA quien se encarga de su aplicación e interpretación. La vigencia de dicho documento es de 18 años para especies perennes (forestales, frutícolas, vides, ornamentales) y sus partainjertos, y quince años para las especies no mencionadas.

La Ley Federal de Variedades Vegetales fue publicada el 25 de octubre de 1996 en el Diario oficial de la Federación, la cual ha sido configurada bajo los principios generales del Acta de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) de 1978 (México depositó su instrumento de adhesión a la UPOV el 9 de julio de 1997, por lo que entró en vigor –el Convenio de 1978– el 9 de agosto de 1997). La fecha de publicación de Ley coincide con los datos estadísticos en donde se tiene los primeros registros de solicitudes de títulos de obtentor de variedades de Chile.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de una línea genéticamente homogénea de criollo de Morelos 334**

De las agrupaciones con el coeficiente de Nei and Li Dice (1979) generados del análisis de la matriz de datos binarios decodificados a partir perfiles de la Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés). Se utilizó la agrupación que incluyó el mayor número de individuos para llevarlos al invernadero en donde se multiplicaron por tres generaciones consecutivas de autopolinización. Fueron las semillas de la tercera generación las que se utilizaron en esta investigación para realizar la caracterización morfológica y molecular.

### **Evaluación de Resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian**

En total 100 semillas de CM-334 se desinfectaron con hipoclorito de sodio libre a 1.5% volumen/volumen (CLORALEX® El Rendidor®, México) por un minuto 30 segundos, después lavadas con agua destilada estéril hasta no percibir el olor a cloro. Fueron colocadas en cajas de plástico (15x20x5 cm) con papel absorbente estéril húmedo y mantenidas en oscuridad a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  en una incubadora (Incubator C800, YAMATO®, Japón). A los 11 días, solo 50 plántulas fueron sembradas individualmente en vasos de plásticos No.0 (Envases Cuevas, S. A. de C.V., México) con arena de río estéril como sustrato, colocadas en cámara bioclimática con 16 horas luz y 10 oscuridad. Cuando

presentaron de 6 a 8 hojas verdadera, fueros inoculada en la base de la planta con  $30 \times 10^5$  zoospora de *Phytophthora capsici* (Cepa 6143, proporcionada por la Dra. Sylvia Fernández Pavía de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). En la evaluación de resistencia, se incluyeron 10 plantas de chile (*C. annuum* L) de la misma edad de la variedad Yolo Wonder como control de patogenicidad del oomiceto. La observación se hizo por 7 días para registrar los síntomas de marchitez asociados al ataque de este patógeno a las plantas susceptibles. Finalizada la evaluación de resistencia, para la caracterización morfológica y molecular, las plantas del criollo de Morelos fueron trasplantadas en bolsas para maceta de 20x25 cm con una mezcla (2:1) de Peat moss mezclado con tezontle y establecidas en invernadero. Se regaron cada tercer día y fertilizaron cada semana con una solución de Nitrofoska<sup>®</sup> azul especial COMPO<sup>®</sup> (12-12-17-2 mg Mg) 3 g<sup>-L</sup>.

### Caracterización Morfológica

Finalizada la evaluación de resistencia, se trasplantaron 26 plantas bajo condiciones de invernadero. Con las cuales se evaluaron 59 descriptores morfológicos y agronómicos propuestos por el IPGRI 1995 (Cuadro 1). Para la caracterización morfológica y con ello presentar un informe técnico del material propuesto como “línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a *Phytophthora capsici*” se siguió las indicaciones de la guía del IPGRI para cada dato.

Cuadro 1. Descriptores cualitativos y cuantitativos utilizados en la caracterización morfológica de una línea de criollo de Morelos 334.

	Cualitativos	Cuantitativos
<b>Datos de Plántula</b>		
Color del hipocótilo		Longitud de hoja cotiledonal
Pubescencia del hipocotíleo		Ancho de la hoja cotiledonal
Color de la hoja cotiledónea		
<b>Datos de la planta</b>		
Ciclo de vida		Altura de la planta
Color de tallo		Ancho de planta
Antocianinas del nudo		Longitud de tallo

Forma del tallo	Diámetro de tallo
Pubescencia del tallo	
Hábito de crecimiento de la planta	
Densidad de ramificación	
Macollamiento	
Densidad de hoja	
<b>Primer fruto maduro en 50% de plantas</b>	
Color de la hoja	Longitud de la hoja madura
Forma de la hoja	Ancho de la hoja madura
Margen de la lámina foliar	
Pubescencia de la hoja	
<b>Inflorescencia</b>	
Posición de la flor	
Color de la corola	Numero de flores por axila
Color de la mancha de la corola	Longitud de la corola
Forma de la corola	Longitud del filamento
Color de las anteras	Longitud de antera
Color de filamento	
Exserción del estigma	
Pigmentación del cáliz	
Margen del cáliz	
Constricción anular del cáliz	
<b>Fruto</b>	
Forma del fruto	
Forma del fruto en unión con el pedicelo	Longitud del fruto
Cuello en la base del fruto	Ancho del fruto
Forma del ápice del fruto	Peso del fruto
Vestigios de floración en el fruto	Longitud de pedicelo de fruto
Arrugamiento transversal del fruto	Espesor de la pared de fruto
Numero de lóculos	
Tipo de epidermis del fruto	

Longitud de la placenta

### **Semilla**

Color de la semilla

Diámetro de la semilla

Superficie de la semilla

Peso de 1000 semillas

Tamaño de la semilla

Número de semillas por fruto

---

### **Caracterización Molecular**

**Extracción DNA.** Se pesó en promedio 500 mg de hojas por planta, cada muestra fue pulverizada en mortero con nitrógeno líquido ( $N_2$ ) hasta obtener un polvo fino e inmediatamente transferidos en tubos Eppendorf de 2 ml, se le agregó 750  $\mu$ L de buffer extracción [CTAB A 2.5 % peso/volumen, 1.4 mM de NaCL, 20 mM de EDTA, 100 mM de TRIS·HCL, pH 8.0 y 0.2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (adicionado al momento de la extracción)]. Se incubaron en baño maría (Rotary Vacuum Evaporator NE-1S, WHEATON®, Japón) por una hora agitándolos cada 10 minutos en un agitador tipo vórtex Modelo Apollo (CLP Molecular Biology, USA). Se les agregó 750  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 agitándolos por 10 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 8500 g en una centrifuga modelo EVA 21(Hettich Zentrifugen, Alemania), la fase superior se pasó a tubos Eppendorf nuevo de 1.5 ml y se le agregó un volumen de 2-propanol y se mezcló por inversión de tubos. Se incubaron por una hora a  $-20^\circ\text{C}$ , se centrifugaron por 10 minutos a 8500 g, se decantó la fase líquida cuidando no perder la pastilla, para lavarla se le agregó a cada tubo un ml de etanol a 70%, acción que se repitió 2 veces. Para secar el pellet de DNA, los tubos se colocaron invertidos sobre toallas de papel (Sanitas®). El DNA se resuspendió en 200  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

### **Cuantificación e integridad del DNA**

Para determinar el rendimiento y pureza del DNA, se utilizó un espectrofotómetro modelo ND-1000 (NanoDrop®, USA).

## Perfiles de DNA mediante RAPD

Para generar los perfiles con iniciadores de RAPD, se hicieron pools de DNA de 3 plantas cada uno. La cantidad de ácido nucleico por individuo fue  $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . La concentración de los elementos de PCR fue Buffer 1X,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, dNTP's 0.2 mM; por reacción 20 pMol de oligonucleótidos, 1.5 U de TaqDNA polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Promega. USA), 90 ng de DNA y agua libre de nucleasas hasta ajustar un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . El programa de termociclaje fue  $94^\circ\text{C}$  4'' para la predesnaturalización, 40 ciclos ( $94^\circ\text{C}$  40'' de desnaturalización,  $44^\circ\text{C}$  40'' de alineamiento y  $72^\circ\text{C}$  1.5' de extensión) y extensión final de  $72^\circ\text{C}$  10' en un termociclador TC 512 (TECHNE, UK). Se utilizaron siete iniciadores RAPD, la secuencia y programa de amplificación se muestra en la tabla 2.

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores aleatorios usados en estudio de homogeneidad genético molecular de criollo de Morelos 334 multiplicado por tres generaciones de autopolinización.

Clave	Secuencia	Temperatura de alineamiento
A02	(5'->3'): tgc cga gct g	44°C
A08	(5'->3'): gtg acg tag g	44°C
A15	(5'->3'): ttc cga acc c	44°C
A17	(5'->3'): gac cgc ttg t	44°C
B14	(5'->3'): tcc gct ctg g	44°C
B19	(5'->3'): acc ccc gaa g	44°C
D04	(5'->3'): tct ggt gag g	44°C

## Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Para visualizar los perfiles genético molecular obtenidos con amplificación aleatoria del DNA polimórfico, los productos de PCR se separaron en gel de poliacrilamida (29:1 de acrilamida-bisacrilamida) de dos fases, la primera, staking gel (gel concentrador) fue de 5% y el runing gel (gel separador) de 16%. La electroforesis se hizo en una cámara vertical MGV-216-33 (C.B.S. Scientific Company. Inc. U.S.A) usando buffer de corrida TBE 1X.

De cada muestra, se cargó 6  $\mu$ L mezclado con 1.6  $\mu$ L de buffer de carga SGV 5X. El tiempo de corrida fue de seis horas a 200V. La tinción y revelado de las huellas de DNA se hizo con nitrato de plata y formaldehído. Proceso en que gel fue sumergido por 15 minutos en una solución de fijación, después por 5 minutos en solución de nitrato de plata a 0.1%, se enjuagó con agua corriente por 5 a 10 s y finalmente se dejó en solución de revelado (hidróxido de sodio más formaldehído a 3% y 0.1 %, respectivamente) hasta que todas las bandas del marcador de peso molecular fueron visibles. Para el revelado se utilizó un agitador automatizado y una campana de extracción. El gel se fotodocumentó con una cámara digital Canon PowerShot A640 (Canon. Inc. China)

### **Análisis estadístico de datos moleculares**

Los perfiles de DNA de las plantas fueron decodificados en una matriz de datos binario de 1 y 0, uno en los individuos que presentaron bandas de igual longitud y cero donde estas no se observaron. Esto se hizo con cada iniciador, las tablas de datos binarios de todos los iniciadores se conjuntaron y se analizaron con el software NTSYSpc ver. 2.21c (Rohlf, 2009). Para determinar el nivel de heterogeneidad genética, la distancia genética se calculó con el coeficiente de Jaccard. La agrupación se hizo por el método de UPGMA y el cladograma se dibujó con SHAN.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Resistencia de la línea criollo de Morelos 334.** Después de siete días, todas la plantas de chile de la variedad Yolo Wonder murieron presentando los síntomas de marchitez. Ninguna de las plantas de la línea F3 de chile criollo de Morelos presentó síntomas después de ser inoculados con zoosporas de *P. capsici*. Estos resultados indican, que la población inicialmente seleccionada como genéticamente homogénea por presentar un nivel de similitud del 100 % en sus perfiles de ADN con RAPD, es resistente y que después de tres generaciones sucesivas de autopolinización, no hubo segregación de genotipos con variaciones en su nivel de resistencia.

**Caracterización Morfológica.** En el cuadro 3, se presenta el informe técnico de los descriptores que permiten establecer niveles de variación o similitud de una colecta de

material vegetal. De acuerdo al IPGRI (1995), usando los descriptores más discriminantes, se puede precisar que la “línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a *Phytophthora capsici*”, es un planta anual, con tallos de color morado oscuro a los 30 días de emergida las plántulas. Con una altura de 89 cm y hábito de crecimiento erecto. A partir de la etapa de floración, las plantas presentan una flor por axila, el color de la corola es blanco y el de las anteras es morado, sin esterilidad masculina. Los frutos son de color negro antes de la madurez y rojos en estado maduro, de forma triangular, con 39 mm de longitud por 14 mm ancho. Los frutos pesan en promedio 3 g, sin presentar un cuello en su base y de epidermis liso. Las semillas son color amarillo paja, con 42 semillas en promedio por fruto.

Cuadro 3. Informe técnico de la caracterización morfológica de “línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a *Phytophthora capsici*”.

Cualitativos	Cuantitativos
<b>Datos de Plántula</b>	
Color del hipocótilo: <b>Morado</b>	Longitud de hoja cotiledonal: <b>12.87 mm</b>
Pubescencia del hipocotíleo: <b>Abundante</b>	Ancho de la hoja cotiledonal: <b>4.20 mm</b>
Color de la hoja cotiledónea: <b>verde</b>	
<b>Datos de la planta</b>	
Ciclo de vida: <b>anual</b>	Altura de la planta: <b>89.84 cm</b>
Color de tallo: <b>morado oscuro</b>	Ancho de planta: <b>34.64 cm</b>
Antocianinas del nudo: <b>morado oscuro</b>	Longitud de tallo: <b>27.08 cm</b>
Forma del tallo: <b>cilíndrico</b>	Diámetro de tallo: <b>6.58 mm</b>
Pubescencia del tallo: <b>denso</b>	
Hábito de crecimiento de la planta: <b>erecto</b>	
Densidad de ramificación: <b>denso</b>	
Macollamiento: <b>intermedio</b>	
Densidad de hoja: <b>intermedio</b>	
<b>Primer fruto maduro en 50% de plantas</b>	

Color de la hoja : **verde oscuro**

Forma de la hoja: **lanceolada**

Margen de la lámina foliar: **entera**

Pubescencia de la hoja: **densa**

### **Inflorescencia**

Posición de la flor: **intermedia**

Color de la corola: **blanco**

Color de la mancha de la corola: **morado**

Forma de la corola: **Acampanulada**

Color de las anteras: **morado**

Color de filamento: **morado**

Exserción del estigma: **exserto**

Esterilidad masculina: **Ausente**

Pigmentación del cáliz: **ausente**

Margen del cáliz: **intermedio**

Constricción anular del cáliz: **presente**

### **Fruto**

Forma del fruto: **triangular**

Forma del fruto en unión con el pedicelo:

**obtusos**

Cuello en la base del fruto: **ausente**

Forma del ápice del fruto: **puntudo**

Vestigios de floración en el fruto: **presente**

Arrugamiento transversal del fruto: **leve**

Numero de lóculos: **dos**

Tipo de epidermis del fruto: **liso**

Longitud de la placenta: **>1/2 del fruto**

### **Semilla**

Longitud de la hoja madura: **8.55 cm**

Ancho de la hoja madura: **3.14 cm**

Numero de flores por axila: **1 flor**

Longitud de la corola: **12.97 mm**

Longitud del filamento: **2.95 mm**

Longitud de antera: **3.28 mm**

Longitud del fruto: **39.69 mm**

Ancho del fruto: **14.43 mm**

Peso del fruto: **3.25 g**

Longitud de pedicelo de fruto: **2.77 cm**

Espesor de la pared de fruto: **1.7 mm**

Color de la semilla: **amarillo**  
Superficie de la semilla: **rugosa**  
Tamaño de la semilla: **Intermedia**

Diámetro de la semilla: **3.64 mm**  
Peso de 1000 semillas:  
Número de semillas por fruto: **42**

---

Las imágenes de descriptores propuestos por el IPGRI (1995) que fueron medidos en la “línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a *Phytophthora capsici*” se muestran en las figuras 1, 2, 3 y 4 para la categoría de plántula, planta, inflorescencia, fruto y semillas.



**Figura 1: Coloración y pubescencia de hipocótilo; forma y color de hoja cotiledonal**



**Figura 2: Imágenes para descriptores de planta**



Figura 3: Imágenes para descriptores de inflorescencia.



Figura 4: Imágenes para descriptores de fruto y semilla.

## Caracterización Molecular

### Perfiles RAPD-PCR

Los resultados de la electroforesis en gel poliacrilamida de dos fases se muestran en las figuras 4 y 5. Para cada primer se hizo una matriz de datos binarios, considerando bandas monomórficas y polimórficas, que fueran bien definidas y cuyo tamaño en pares de base oscilaran entre 3000 y 200 pares de bases. Con la cual se calculó la distancia genética y establecer el nivel de similitud entre los individuos de la población evaluada. Como se observa en la figura 5, la población que se seleccionó inicialmente como una población genéticamente homogénea, después de tres generaciones de multiplicación por autopolinización, su característica de homogeneidad no tuvo alteración alguna.

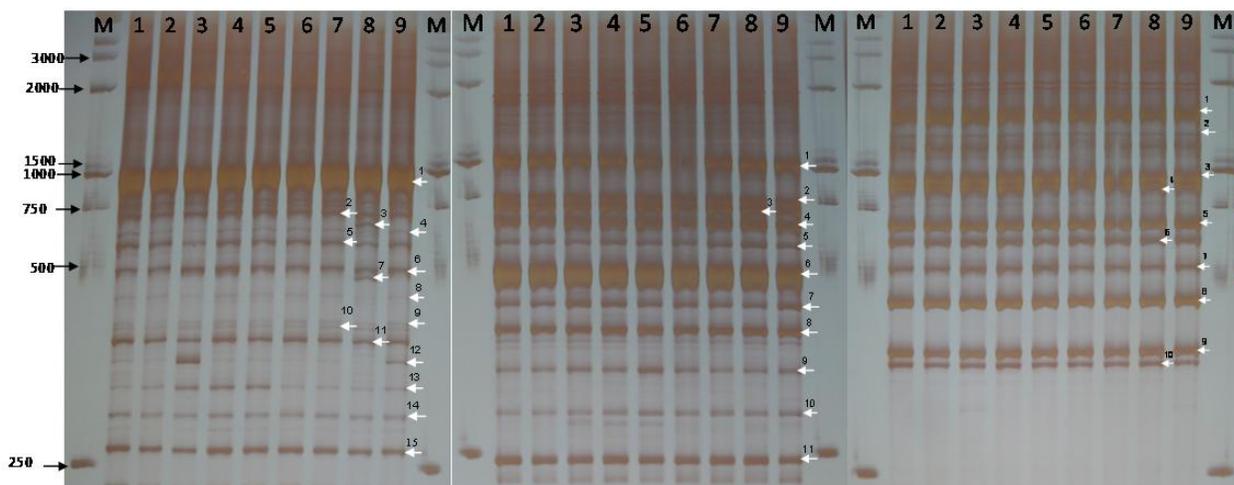
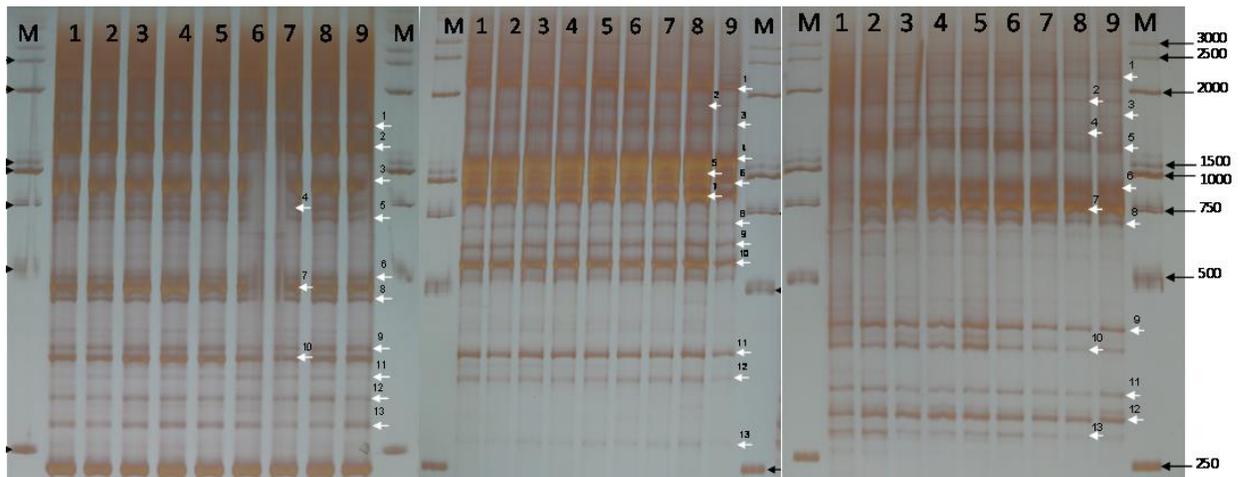


Figura 5. Perfiles de DNA generados con RAPD. Cada conjunto de nueve carriles corresponde a perfiles por primer. Primer conjunto: primer A02; segundo conjunto: primer A08; tercer conjunto: primer A15. M: marcador de peso molecular 1 kb de Fermentas

La capacidad exploratoria de cada primer estuvo en función del número de sitios en que hibridaron en el genoma de la población de chile criollo de Morelos 334 evaluados. El primer A02 amplificó 15 bandas bien definidas, 13 bandas los primer A17, B14, B19 y D04. Los que hibridaron en un menor número de sitios, fueron los primer A08 y A15 con 11 y 10 bandas bien definidas. Las huellas de ADN de la población del criollo de Morelos multiplicado por tres generaciones de autopolinización, generado con los oligonucleótidos A17, B19 y D04, figura 5, demuestran que es una población genéticamente homogénea.



**Figura 6. Perfiles de DNA generados con RAPD. Cada conjunto de nueve carriles corresponde a perfiles por primer. Primer conjunto: primer A17; segundo conjunto: primer B19; tercer conjunto: primer D04. M: marcador de peso molecular 1 kb de Fermentas**

El análisis estadístico de la matriz de datos binarios agrupó a los 26 individuos como una población genéticamente homogénea, con 100 % de similitud (figura 6). Estos resultados indican que la población seleccionada y multiplicada por tres generaciones consecutivas de autopolinización es altamente estable. Que la variación por los procesos de recombinación no fue detectada con los primers utilizados en el presente estudio. Además esto es debido a que las plantas de *C. annuum* L son básicamente de autopolinización. Disponer una línea genéticamente homogénea o con una variabilidad muy baja y resistente a *P. capsici*, representa una importante opción para incorporarlo a un programa de mejoramiento genético (Candole *et al.*, 2010) y estudios de patogenicidad de diferentes aislamientos de este oomiceto. Una línea genéticamente homogénea permitirá hacer una discriminación precisa y rápida de razas fisiológicas de *P. capsici* y puede ser de utilidad para el fitomejorador en la selección de plantas resistentes (Monroy y Bosland, 2010). Además, contar con una línea de chile criollo de Morelos altamente estable, genéticamente homogénea y resistente a la marchitez, hace posible su uso para generar una población de líneas híbridas recombinantes (Recombinant Inbred Lines, RILs por sus siglas en Inglés) y mediante comparación de marcadores moleculares con respuestas de susceptibilidad o resistencia a

*P.capsici* de las progenies de estas líneas, poder determinar si la resistencia es debida a mucho alelos ubicados en unos pocos locis o muchos genes localizados en múltiples alelos dentro del genoma de la línea resistente (Monroy y Bosland, 2008)

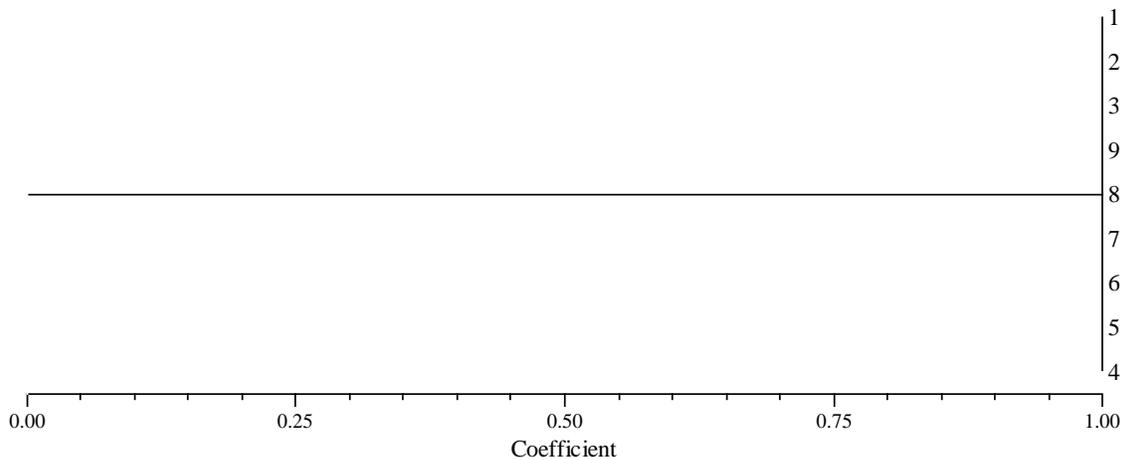


Figura 7. Dendrograma de similitud de la línea de criollo de Morelos 334.

Tradicionalmente, se utilizan caracteres morfológicos y fisiológicos para determinar la pureza varietal (IPGRI, 1995). Estos no son tan eficientes debido a que la descripción por marcadores fenotípicos (descriptores) presenta limitaciones que son afectados por las condiciones ambientales y dependen del estado fenológico de la planta, limitando la selección de recursos genético apropiado para su uso en un programa de mejoramiento genético. La combinación de descriptores más marcadores moleculares permite validar la homogeneidad a nivel intra-varietal discriminando otras variantes y demostrando la pureza de un material para solicitar un título de obtentor. Para solicitar un título de obtentor, el interesado debe demostrar que su variedad a registrar cumple con los requisitos de ser distinta, estable y homogénea (DUS), características que lo establece la UPOV (2006). Entendiendo cómo distinta cuando la variedad vegetal se distingue técnica y claramente por uno o varios caracteres pertinentes de cualquiera otra variedad. Homogeneidad: si la variedad vegetal es suficientemente uniforme en sus caracteres pertinentes, a reserva de la

variación previsible por su reproducción sexuada o multiplicación vegetativa. Estabilidad: Si conserva inalterados sus caracteres pertinentes, después de reproducciones o propagaciones sucesivas.

La población de chile criollo de Morelos 334, seleccionada como genéticamente homogénea mediante huellas de DNA con RAPD, multiplicada hasta la F3 por autopolinización en condiciones de invernadero, no mostró síntoma de marchitez después de ser inoculadas con *P. capsici*. El cual, después de analizarla mediante huellas de ADN con RAPD, no se presentó variación, resultados que demuestran que el método de selección para obtener una línea pura fue adecuado, es genéticamente homogénea y estable. Además de ser distinta a la población original del que se obtuvo.

## CONCLUSIÓN

Mediante marcadores de ADN generados con RAPD, fue posible obtener una línea pura de criollo de Morelos 334 resistente a *P. capsici*. La cual es molecularmente distinta a la población original, es estable y genéticamente homogénea, lo que fortalece a los descriptores morfológicos empleados del IPGRI para Capsicum y con ello solicitar el título de obtentor para este valioso material genético.

## LITERATURA CITADA

**Candole, B. L., P. J. Conner, and P. Ji. 2010.** Screening *Capsicum annuum* accessions for resistance to six isolates of *Phytophthora capsici*. HortScience 45:254–259

**Djian-Caporalino C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubèze, A. Palloiz, A. Damalssó, P. Abad. 1999.** Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). Theor Appl Genet. 99: 496-502

**Hernández-Verdugo, S., F. Porras, A. Pacheco-Olvera, R. G. López-España<sup>1</sup>, M. Villarreal-Romero, S. Parra-Terraza y T Osuna E. 2012.** Caracterización y variación

ecogeográfica de poblaciones de Chile (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*) silvestre del noroeste de México. *Polibotánica*. 33: 175-191.

**IPGRI, AVRDC y CATIE. 1995.** Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 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. 51 p.

**Ley Federal de Variedades Vegetales.**- Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 De Octubre de 1996.

**López L., P. y F. H. Castro G. 2006.** La diversidad de los chiles (*Capsicum* spp., Solanaceae) de Oaxaca. *In:* López L. P y S. Montes H. (eds.). 2006. Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. Celaya, Gto. México. 466 p. (Libro Científico Núm. 1). Pp. 135-178

**Martínez-Sánchez, D., M. Pérez-Grajales, J. E. Rodríguez-Pérez, E del C. Moreno Pérez. 2010.** Colecta y caracterización morfológica de ‘chile de agua’ (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16: 169-176

Massieu, Y. y F. Chapela. 2002. Acceso a recursos biológicos y biopiratería en México. *El Cotidiano* 114: 72 - 87

**Monroy-Barbosa, A. and P. W. Bosland. 2008.** Genetic analysis of *Phytophthora* root rot race-specific resistance in Chile pepper. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 133:825–829.

**Monroy-Barbosa, A. and P. W. Bosland. 2010.** A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. *Plants. HortScience* 45:1563–1566.

**Redondo, J. E. 1979.** Búsqueda de genotipos resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México. *Proceedings of the Tropical Region. American Society for Horticultural Science* 23: 220–224.

**Reglamento de la Ley Federal de Variedades Vegetales**, Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 24 de septiembre de 1998.

**Rohlf, F. J. 2009.** NTSYSpc: numerical taxonomy system. ver. 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York.

**Rosario, R. J. 2012.** Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. SAGARPA, SNICS, No. 5. México. 36 p.

**SAGARPA, SNICS. 2012.** Gaceta oficial de los derechos de obtentor de variedades vegetales. No 15. 165 p.

**Tarrío G., M., L. Concheiro B. y S. Comboni S. 2004.** La biopiratería en Chiapas: un análisis sobre los nuevos caminos de la conquista biológica. Estudios sociales, 24: 56-89.

**UPOV. 2006.** Ají, Chile, Pimiento. Código de la UPOV: CAPSI\_ANN. *Capsicum annuum* L. Directrices para la ejecución de exámenes de la distinción, homogeneidad y estabilidad. Documento Técnico /76/8. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. Ginebra. 47 p.

### CAPITULO III

#### MICROPROPAGACIÓN DEL CHILE CRIOLLO DE MORELOS 334 (*Capsicum annuum* L.) Y USO POTENCIAL COMO PORTA INJERTO DE *C. pubescens* R & P

##### RESUMEN

México cultiva y consume diversas variedades de chile, principalmente de la especie *Capsicum annuum* L. Recientemente también ha aumentado el consumo y demanda de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P), destinándose una mayor superficie para su cultivo. Plantaciones que son afectadas por el ataque de *Phytophthora capsici*, enfermedad para el cual no hay registro de fuentes de resistencia. En *C. annuum*, el genotipo Criollo de Morelos 334 (CM-334) es resistente, pero genéticamente incompatible con el chile manzano para utilizarlo en un programa de mejoramiento. Sin embargo, este criollo puede utilizarse como portainjerto de *C. pubescens*. No obstante, *in vivo*, la asociación puede resultar baja o nula por incompatibilidad ya sea botánica o física. Para superar esta incompatibilidad, se realizó esta investigación con el objetivo de desarrollar un protocolo de micropropagación de CM-334 y utilizarlo como portainjerto de brotes de *C. pubescens* bajo condiciones *in vitro*. Los resultados demostraron que fue el medio MS con ANA+BA (0.01+0.1 mg L<sup>-1</sup>) +TRIA (10 µg L<sup>-1</sup>) el más apropiado para la multiplicación y conservación *in vitro* de CM-334. Se observó el 100% de prendimiento en los microinjertos de tipo diagonal o lengüeta, que se mantuvieron en un medio con agua-agar (6 g L<sup>-1</sup>) adicionado con BA (0.1 mg L<sup>-1</sup>) y posteriormente crecieron y desarrollaron más raíces cuando fueron transferidos a un medio MS suplementado con ANA+BA (0.01+0.1 mg L<sup>-1</sup>) +TRIA (10 µg L<sup>-1</sup>). Durante la etapa de aclimatación, 60% de los microinjertos sobrevivieron estableciéndose exitosamente en condiciones de invernadero y se logró una sobrevivencia del 94 % de las plantas injertadas después de ser inoculados con 3x10<sup>5</sup> zoosporas de *P. capsici*. Este es el primer reporte en donde se informa que el CM-334 puede ser utilizado como porta injerto del chile manzano para control de la marchitez o secadera.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, *Capsicum pubescens*, CM-334, injerto *in vitro*, *Phytophthora capsici*, resistencia.

## INTRODUCCIÓN

México es considerado como centro de domesticación y de mayor diversidad genética de *Capsicum annuum* L., la cual está determinada por el grado de pungencia, color, forma y tamaño del fruto en la madurez, así como el grosor del pericarpio (Aguilar *et al.*, 2010). De acuerdo a diversos estudios, la preferencia en el consumo de las distintas variedades de chile, depende del nivel social, económico y cultural de los consumidores en las diferentes zonas geográficas del país (Rodríguez, 2005; Castellón *et al.*, 2012). Aun cuando se cultivan variedades de otras especies de chile como *C. frutescens* y *C. chinensis*, el *Capsicum pubescens*, denominado chile manzano ha adquirido mayor importancia económica y aceptación en la Cocina Mexicana.

*Capsicum pubescens* fue descubierta, descrita y llamada como tal en 1794 por Ruíz y Pavón (Nuez *et al.*, 1996). Probablemente originaria de las tierras altas de Bolivia y domesticada en los Andes, donde a menudo es llamado como rocoto en lengua Quechua = ruqutu o locoto en lengua Aimara = Lucutu (Bosland y Votava, 2000; Eshbaugh, 2012). Su distribución abarca desde México hasta Perú creciendo en los Andes, entre los 1500 y 3000 msnm y en las tierras altas de América Central cultivado en huertos familiares (Bosland y Votava 2002). Esta especie es morfológica y genéticamente distinta a las otras especies domesticadas de chile. Genéticamente está asociado a *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. tovarii* (Eshbaugh, 2012).

Probablemente se introdujo en México y América Central en 1930, actualmente está bien establecida en Costa Rica, Guatemala y en México (Rick, 1950; Eshbaugh, 1976; Kumar y Krishna, 2003). En México se cultiva en los estados de Michoacán, Querétaro, Chiapas, Oaxaca, México, Puebla, Veracruz e Hidalgo. (Aguilar *et al.*, 2010; Pérez y Castro, 2008). Debido a la creciente demanda de chile manzano para el mercado nacional y de exportación, se han desarrollado dos sistemas de producción uno intensivo de tipo anual y otro en invernadero (Pérez *et al.*, 2004), sistema en donde se tiene mayor control del manejo del cultivo (Pérez y Castro, 2008).

Sin embargo, su producción es disminuida por el ataque de *Phytophthora capsici* Leonian ocasionando marchitez o secadera de las plantas de *C. pubescens* R & P (Pérez y Castro, 2008). Enfermedad que también se ha reportado en Perú dañando tanto plantas (Hurtado *et al.*, 2008) como frutos (Hulvey *et al.*, 2011). El método de mayor uso para el combate de la enfermedad es el empleo de fungicidas, sin embargo, es cuestionado por su reducida eficiencia, además de que el uso excesivo de estos químicos contaminan el suelo e inducen resistencia en el oomiceto (Qi *et al.*, 2012). El procedimiento más amigable con el medio ambiente, económico y perdurable es el uso de variedades resistentes pero hasta ahora no se ha reportado el hallazgo de ningún genotipo de *C. pubescens* resistente a *P. capsici*.

No obstante, Redondo en 1979, publica el descubrimiento de un genotipo de Chile (*C. annuum* L.) conocido como criollo de Morelos 334 (CM-334), como el más resistente a *P. capsici*, el cual ha resultado ser resistente en diferentes partes del mundo ante pruebas de inoculación con aislamiento de *P. capsici* de variada patogenicidad (Glosier *et al.*, 2008), sin embargo, no es una opción para utilizarlo en un programa de mejoramiento genético convencional, debido a que las cruces interespecíficas que se han realizado entre *C. annuum* L. y *C. pubescens* R & P han resultado ser incompatibles (Zijlstra *et al.*, 1991). Estos autores identificaron la incompatibilidad en la polinización cruzada de estas especies cuando polinizaron pistilos de *C. pubescens* R & P con polen de *C. annuum* L, no hubo desarrollo del tubo polínico, y cuando polinizaron pistilos de *C. annuum* L con polen de *C. pubescens* R & P, el tubo polínico no penetró. En ambos casos no hubo fecundación y por lo tanto ausencia de progenie.

Por otro lado, el Chile manzano cada vez tiene mayor aceptación en la dieta del mexicano, por lo que los últimos años ha aumentado la demanda del producto. Esto ha motivado a los productores a incrementar la superficie para su cultivo, usando variedades más productivas y adoptando sistemas de producción bajo invernaderos. Sin embargo, el riesgo de no cubrir la demanda del mercado continua latente debido a la incidencia de la marchitez del Chile, enfermedad para la cual hasta el momento no se ha desarrollado

ninguna variedad resistente. Por lo anteriormente expuesto, el CM-334 por ser resistente a la marchitez representa una opción para ser utilizado como portainjerto de chile manzano.

El Injerto es el arte de unir las zonas del cambium de dos plantas diferentes, de tal manera que al fusionarse puedan crecer y desarrollarse como un solo individuo. La porción que recibe el injerto se llama patrón o portainjerto, el cual servirá de soporte y dará origen al sistema de raíces (Hartmann *et al.*, 2010). Generalmente es tolerante o resistente a estreses bióticos y abióticos (King *et al.*, 2010). La porción que va fijada al patrón es el injerto, esta puede ser una yema o una sección de tallo de una variedad comercial. Para una unión exitosa, es necesario que el cambium de las dos secciones sea colocado lo más cercano posible. Sin embargo, existen otros factores que pueden limitar el éxito como: 1) la incompatibilidad que puede presentarse cuando las especies involucradas, botánicamente sean muy distantes y 2) las condiciones ambientales como por ejemplo, las temperaturas altas pueden reducir la actividad en la cicatrización o una humedad relativa baja puede causar la deshidratación del injerto (Hartmann *et al.*, 2010). Por otro lado, existen evidencias de la aplicación exógena en los sitios de unión del injerto de reguladores de crecimiento, particularmente auxinas (AIB, ANA) y citocininas (BA), para favorecer la cicatrización y consecuentemente aumentar el éxito de los injertos, como lo demostraron Parkinson y Yeoman, (1982) demostraron que aplicaciones de AIB al medio de cultivo favoreció el prendimiento al efectuar injertos *in vitro* de *Lycopersicon esculentum*, *Datura estramonium* y *Nicandra physaloides*.

Por otro lado, no existen trabajos donde se haya investigado el uso de injerto *in vivo* o *in vitro* en estas dos especies. El presente trabajo tuvo como objetivos el desarrollar un protocolo para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* del chile Criollo de Morelos 334 (CM-334), para usarlo como patrón, así como implementar la técnica de microinjerto con brotes de chile manzano, evaluando la compatibilidad y la funcionalidad de la asociación comprobando su resistencia a la marchitez inoculándolos con zoosporas de *Phytophthora capsici* en condiciones de invernadero.

## **MATERIALES Y METODOS**

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio e invernadero del Posgrado de Recursos Genético y Productividad-Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

### **Material Vegetal**

A partir de una población de 200 plantas de CM-334 se seleccionó una población genéticamente homogénea mediante comparación y agrupación por similitud de huellas genéticas. Estas fueron generadas mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con la técnica de Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés). Se utilizó la agrupación que incluyó el mayor número de individuos para llevarlos al invernadero en donde se multiplicaron por tres generación consecutivas de autopolinización. Fueron las semillas de esta población las se utilizaron en esta investigación.

### **Establecimiento *in vitro* del criollo CM-334**

#### **Desinfección de semillas**

Se lavaron 130 semillas de CM-334 con jabón líquido por 20 minutos, en seguida se sumergieron por 20 minutos en una mezcla de bactericida (Agry-micin® 100) más fungicida (Cursate®). Se usó un agitador automático a 250 RPM, después de cada lavado, se enjuagaron con agua del grifo hasta eliminar completamente residuos del detergente y del agroquímico. Para la desinfestación superficial se probaron exposiciones con etanol al 70% a diferentes tiempos (15, 30 y 60 segundos), posteriormente se lavaron en repetidas ocasiones con agua destilada estéril y por último en campana de flujo laminar se trataron con cloro comercial (Cloralex®) a 10, 15 y 20 % por 15 minutos (Cuadro 1), inmediatamente después las semillas se lavaron con agua destilada estéril y secaron sobre toallas de papel estéril por 5 minutos.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección superficial y su efecto en % de germinación de semillas de chile (*Capsicum annuum* L), criollo de Morelos 334 (CM-334).

Tratamiento	Etanol al 70 %			Cloro comercial			No. de semillas
	15 s	30 s	60 s	10 %	15 %	20 %	
T1	X			X			10
T2	X				X		10
T3	X					X	20
T4		X		X			10
T5		X			X		20
T6		X				X	10
T7			X	X			20
T8			X		X		10
T9			X			X	10
T10				X			10

### **Siembra *in vitro***

Después de la desinfección, las semillas de cada tratamiento fueron introducidas individualmente en tubos de ensayo (150 mm X 25 mm) con medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de sus macrosales. Se colocaron en un cuarto de incubación a 25°C ± 2°C, en condiciones de oscuridad. En cuanto la plántula liberó la testa, se colocó a la luz en un fotoperiodo de 16 h de luz por ocho h de oscuridad.

### **Multiplicación *in vitro***

Una vez que las plántulas tuvieron de seis a 10 hojas verdaderas, se cortó el ápice, el que fue transferido a un medio MS completo, con suplemento de diferentes hormonas y concentraciones que fueron utilizados como tratamientos, Cuadro 2. Las condiciones de incubación fueron similares a las anteriores y mantenidos por 40 días.

Cuadro 2. Tratamientos hormonales y su efecto en yemas axilares de tallos del chile (*Capsicum annuum* L) CM-334.

Tratamientos	ANA+BA en mg L <sup>-1</sup>	Tratamientos	(ANA+BA) mg L <sup>-1</sup> +TRIA en µg L <sup>-1</sup>
T1	0.01+0.1	T6	0.01+0.1+2
T2	0.02+0.2	T7	0.01+0.1+5
		T8	0.01+0.1+10
	TDZ en mg L <sup>-1</sup>	T9	0.00+0.0+2
		T10	0.00+0.0+5
T3	0.001	T11	0.00+0.0+10
T4	0.01		
T5	0.1	T0	Control (Sin hormonas)

ANA: Ácido Naftalen Acético, BA: 6-bencil adenina, TDZ: Thidiazuron, TRIA: Triacontanol

### Injerto in vitro

Se utilizaron 100 plantas completas de CM-334 obtenidas in vitro con 6 a 8 hojas verdaderas, como portainjertos para ser injertadas con epicótilos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. & P.) germinados in vitro. Para garantizar una unión fuerte, se evaluaron dos tipos de injerto, uno realizando el corte en forma diagonal o lengüeta y otro cortando en sentido transversal los tallos. El punto de unión en CM-334 fue cinco a 10 mm arriba de las hojas cotiledonares y para *Capsicum pubescens* fue cinco a 10 mm por abajo de las hojas cotiledonares. Los tallos en cada injerto fueron de igual diámetro y se fijaron con pinzas de látex de 1.8 mm de diámetro y se colocaron dentro de tubos con medio MS al 50% de concentración en sus macrosales por 15 días. Después de determinar el método de injerto más apropiado, estos fueron colocados en diferentes medios para determinar el más adecuado para favorecer el prendimiento, la cicatrización e inhibir la incompatibilidad de asociación. Cuadro 3. Las condiciones de incubación fueron similares a las anteriores y mantenidos durante 30 días, tiempo en que fueron evaluados. Los injertos y su transferencia

a los diferentes tratamientos se hicieron en una campana de flujo laminar, con pinza y navaja estéril.

Cuadro 3. Tipo de injerto entre CM-334 y *Capsicum pubescens* y medios solidos con o sin hormonas para injerto *in vitro*.

Tratamiento	Forma de corte en tallo		Tratamiento	Medios solidos		
	Diagonal	Transversal		MS	AA+BA	AA
T1	X		T1	X		
T2		X	T2		X	
			T3			X

MS: Murashige y Skoog al 100% de sus macrosales, AA+BA: Agua Agar (6 g L<sup>-1</sup>)+ 6-Bencil Adenina (0.1 mg L<sup>-1</sup>) y AA: Agua Agar (6 g L<sup>-1</sup>)

### **Crecimiento del injerto y enraizamiento del patrón *in vitro***

Después de evaluar las mejores condiciones para el prendimiento, un total de 56 injertos fueron colocados en diferentes tratamientos para determinar las condiciones óptimas de crecimiento del injerto y enraizamiento del patrón. Se propusieron tres diferentes medios: todos fueron en MS a 100% de sus sales a) Acido Naftalen Acético (ANA) + 6-Bencil Adenina (BA); b) ANA+BA+Triacantanol (TRIA); c) TRIA; a diferente concentración cada uno, además de un control sin hormonas (Cuadro 4). Se incubaron por 40 días con 14 h luz, ocho horas de oscuridad y 26 ± 1°C.

### **Aclimatación del injerto**

Cada injerto se extrajo del frasco, retirando el exceso de medio de la raíz y después sembrados en vasos de unicel del núm. 10 (250 cm<sup>3</sup>) llenados con arena de río estéril como sustrato y se cubrió con un vaso de plástico tipo cristal del núm. 8, como tapa para evitar su deshidratación. Siete días después a cada vaso-tapa se le hizo una hilera de perforaciones, acción que se repitió a los 10 y 14 días con 3 y 4 filas adicionales, dejando la tapa por cinco días más. Después de retirar la cubierta, se dejaron 7 días más en el cuarto de incubación antes de transferirlos al invernadero para evaluar la resistencia del injerto a *P. capsici*.

Durante su aclimatación, las plantas permanecieron en cuarto de incubación con 16 horas luz y ocho horas de oscuridad a una temperatura de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **Funcionalidad y resistencia del injerto a *Phytophthora capsici***

Después de 14 días que los injertos se aclimataron y luego transferidos al invernadero, se inocularon un total de 36 plantas injertadas con una suspensión de  $3 \times 10^5$  zoosporas de *P. capsici* (Cepa 6143, proporcionada por la Dra. Sylvia Fernández Pavía de la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). En la evaluación, se incluyeron plantas de chile Morrón Var. Yolo Wonder (*C. annuum* L.), del CM-334 (*C. annuum* L.) y plantas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P) con sus propias raíces como testigo. Cada planta tuvo en promedio ocho hojas verdaderas, y fueron distribuidos en bloque completos al azar con seis repeticiones, cada repetición con 6 plantas. En cada bloque se colocaron un total de 22 plantas en la siguiente proporción: cinco injertos de chile manzano, seis plantas de Yolo Wonder como control de la patogenicidad de Pc, seis plantas de CM-334 y cinco plantas de *Capsicum pubescen*. A cada planta se le aplicó una suspensión zoosporas de *P. capsici* a nivel de cuello de raíz, se dejó una hilera de cinco plantas de chile manzano sin inocular como control absoluto. La evaluación se realizó cada 24 horas por 14 días para registrar los síntomas de marchitez en cada una de los materiales inoculados con el oomiceto. El riego se realizó diariamente y fertilizó cada semana con una solución de Nitrofoska<sup>®</sup> azul especial COMPO<sup>®</sup> (12-12-17-2 mg Mg) en  $3 \text{ g L}^{-1}$  de agua. A los tallos de los injertos que presentaron marchitez, se les eliminó la sección necrosas, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.5% por 1.5 min y en seguida se enjuagaron con agua estéril. Después se colocaron en cajas Petri con agua estéril y se colocaron en luz blanca. Se revisaron a las 12 horas para verificar el avance de *P. capsici* con la presencia de esporangios.

Cuadro 4. Medio MS con diferentes hormonas, concentración y combinación de las mismas usado como tratamientos en la inducción de raíces y crecimiento *in vitro* del injerto.

Tratamiento	0.01 mg L <sup>-1</sup> ANA;	0.1 mg l <sup>-1</sup> BA	µg L <sup>-1</sup> TRIA
T <sub>0</sub>	Control (Sin hormonas)		
T <sub>1</sub>	X	X	
T <sub>2</sub>	X	X	2
T <sub>3</sub>	X	X	5
T <sub>4</sub>	X	X	10
T <sub>5</sub>			5
T <sub>6</sub>			10

Todos los tratamientos fueron en medio MS al 100% de sus sales. ANA: Ácido Naftalen Acético, BA: 6-Bencil Adenina , TRIA: Triacontanol

#### **Análisis estadístico de datos**

Todos los experimentos de establecimiento, multiplicación, crecimiento del injerto y enraizamiento del patrón *in vitro*; aclimatación, funcionalidad y resistencia de la asociación patrón-injerto a *Phytophthora capsici* fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de rangos múltiples de Duncan ( $\alpha$  0.05), calculado con el software SAS v6.1.17601 (SAS, 1996). Las variables usadas están indicadas en la tabla de resultados de cada experimento.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Desinfección y siembra *in vitro* de semillas de CM-334**

En la mayoría de los tratamientos, la germinación inició a los ocho días y finalizó a los 16. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de semillas germinadas por tiempo de exposición con etanol al 70%. La misma tendencia se observó al comparar los datos de las semillas tratadas con 0.6, 0.9 y 1.8 % de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial, previamente desinfectadas con etanol a 70%. (Cuadro 5). De tener el etanol un efecto biocida, el porcentaje de semillas germinadas disminuiría al aumentar el tiempo de exposición, acción que sería sinergizado al combinarlo con aumentos en la concentración

de cloro comercial. En promedio el 94 % de las semillas germinaron, con una variación del 70 y 90 %, estuvo más ligado a la viabilidad de las semillas y no al efecto de los tratamientos. Desde el establecimiento del experimento hasta la toma de datos, no se registró contaminación por bacterias u hongos y no se observó necrosis o daño en ninguna plántula por efectos de los químicos utilizados.

En *Capsicum* se ha utilizado para la desinfección superficial de semillas, inmersiones en etanol al 70 % por un min y después en una solución de hipoclorito de sodio libre (NaClO) del 1.5 al 6 % (Estrada *et al.*, 2001; Yeon *et al.*, 2010; Otrshy *et al* 2011b; Otrshy *et al.*, 2013) por 10 a 25 min. No obstante también se menciona el uso de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) en concentraciones que van del 0.1 al 1.5 % (Kehie *et al.*, 2012; Himabindu *et al.*, 2012). Pero el uso de este último compuesto es cuestionado por ser demasiado tóxico y muy difícil de remover de los explantes (Roca y Mroginski, 1991). El proceso de desinfección que se siguió en este trabajo fue muy similar a lo reportado, con porcentajes de germinación que van 93 al 100 % al sumergir las semillas de CM-334 en etanol al 70% y en hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.6, 0.9 y 1.8 % por 15 min. Quedando el mejor tratamiento el de inmersión en hipoclorito de sodio al 0.6 % por 15 min.

### **Multiplicación *in vitro***

El mejor tratamiento para la multiplicación *in vitro* de CM-334 fue la combinación de ANA+BA+TRIA en concentraciones de (0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup> y 10 µg L<sup>-1</sup>) en medio MS T8 (Cuadro 6). En los tratamientos que se usó esta mezcla hormonal, todas la microestacas desarrollaron un callo en la base con aumento de tamaño cuando incrementó la concentración de TRIA. Sin embargo, también se vieron favorecidos la ganancia de peso tanto fresco como seco y la rizogénesis. En los tratamientos que solos tuvieron TRIA no hubo ningún efecto en el número de brotes. Para TDZ, su efecto para el desarrollo y tamaño de callo; peso fresco y seco en los explantes fue proporcional con incremento en su concentración en el medio MS pero sin ningún efecto como agente rizogénico. En medio MS suplementado con ANA+BA, el efecto de estas hormonas en las variables fue menor que las obtenidas con TDZ o ANA+BA+TRIA.

Cuadro 5. Efecto del tiempo de exposición en etanol al 70% y a diferentes concentraciones de cloro comercial, en el porcentaje de germinación de semillas de CM-334 establecidas en MS (Murashige y Skoog, 1962).

Tratamiento	Germinación (día/mes)		% de Germinación	
	Inició	Finalizó	Cloro	□ <sup>a</sup>
T1	29/09	9/10	70	
T2	29/09	3/10	100	
T3	29/09	7/10	100	90
T4	29/09	7/10	90	
T5	30/09	10/10	95	
T6	30/09	7/10	100	95
T7	29/09	7/10	100	
T8	29/09	7/10	90	
T9	30/09	30/09	90	93.33
T10	30/09	30/09	98	

<sup>a</sup> Promedio porcentual de semillas germinadas obtenido de la suma por tiempo de exposición a etanol al 70% (T1-T3; T4-T6 y T7-T9)

Los resultados de la multiplicación *in vitro* del chile Criollo de Morelos 334, demuestra que es un genotipo recalcitrante, comportamiento que es común en especies del género *Capsicum* (Mezghani *et al*, 2007; Bairwa *et al.*, 2012). La resistencia a la regeneración pueden variar entre especies (Christopher y Rajam, 1994), cultivares (Ochoa e Ireta, 1990), tipo de explante e incluso de su posición en la plántula (Fari y Czakó, 1981). No obstante, incrementos en la concentración de TRIA en medio MS suplementado con ANA+BA, activó el desarrollo de yemas laterales, raíces y ganancia en peso fresco y seco en microestacas de CM-334. De manera similar, Grzegorzcyk *et al.* (2006), reportaron mayor proliferación de brotes de *Salvia officinalis* L. en medio MS con AIA+BAP+TRIA (0.1, 0.45  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). El efecto del triacantanol en la proliferación también ha sido reportado en otras especies como *Arachis hypogaea* L. (Verma *et al*, 2011) y *Bougainvillea glabra* (Moneruzzaman, *et al.*, 2013). Los experimentos sobre *Melissa officinalis*

desarrollado por Tantos *et al.* (1999), demostraron que el triacontanol afectó de manera positiva el desarrollo y crecimiento de brotes y de raíces. A su vez los resultados de Reddy *et al.* (2002) evidenciaron que aplicaciones de TRIA  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  estimuló el desarrollo de brotes laterales y de las raíces que crecieron más con  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Con  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  hubo una mayor ganancia de peso fresco de *Capsicum frutesces*.

El efecto del TDZ no fue significativo, sin embargo, en varias investigaciones se ha demostrado su efecto positivo en la multiplicación de *C. annuum*, en concentración de 1 y  $18.16 \mu\text{M}$  (Ahmad *et al.*, 2006; Kehie *et al.*, 2012), en combinación con TDZ + ANA ( $2.0$  Y  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Song *et al.*, 2010) y TDZ+AIA ( $1.5$  y  $0.5 \mu\text{M}$ ) (Siddique y Anis, 2006). A su vez, el uso ANA+BA ( $1$  y  $5 \text{mg L}^{-1}$ ), favoreció la multiplicación de los explantes de chile (Arous *et al.*, 2001). Quizás el éxito se deba a que emplearon mayor concentración de BA o porque a diferencia de nuestro experimento, ellos usaron BA+AIA (Bairwa *et al.*, 2012; Otrshy *et al.*, 2011a; Mezghani *et al.* 2007) en concentraciones de  $6 \text{mg L}^{-1}$  o  $22.2 \mu\text{M}$  de BA y de  $1 \text{mg L}^{-1}$  o  $5.7 \mu\text{M}$  de AIA.

### **Injerto in vitro**

El injerto que permitió mejor ensamble y cicatrización fue el de lengüeta, esto debido principalmente a que el corte diagonal permitió mayor superficie de contacto entre tallos, que en el injerto transversal. El medio que mejor favoreció la cicatrización e inhibió la oxidación en el sitio de unión entre tallos de chile manzano y de CM-334 fue el que contenía Agua-Agar suplementado con BA (T2), resultado que no fue tan distinto en los injertos que fueron colocados en Agua-Agar. Cuadro 7. Al usar un medio MS con el 100% de sus macrosales y sin hormonas afectó negativamente al injerto, ya que en los sitios de unión se observaron síntomas de oxidación, así como también en el corte transversal del tallo de portainjerto se observó una coloración café en los haces vasculares y el cambium (Figura 1).

Cuadro 6. Comparación de medias de las variables usadas para medir el efecto de los diferentes tratamientos hormonales en explantes de CM-334 para su multiplicación *in vitro*.

TRAT.	A	B	C	D	E	F	G	H	I
T0	1.18 bac	1.05 b	0.44 ba	7.50 c	0.38 e	27.45 bc	1.10 dc	0.18 d	0.02 cb
T1	1.37 bac	1.27 ba	0.97 ba	93.00 a	5.35 bdc	30.00 bac	1.10 bdc	0.45 ba	0.05 a
T2	1.55 bac	1.15 ba	0.65 ba	95.00 a	4.66 bac	5.00 c	0.05 d	0.28 bdc	0.03 b
T3	1.55 bac	0.85 b	0.65 ba	65.00 b	1.82 dc	5.00 c	0.15 d	0.15 d	0.02 cb
T4	1.60 bac	1.30 ba	0.65 ba	95.00 a	4.27 d	00.00 c	0.00 d	0.22 dc	0.03 cb
T5	1.40 bac	1.35 ba	0.70 ba	100.00 a	5.24 dc	00.00 c	0.00 d	0.42 bac	0.06 a
T6	1.10 bc	1.20 ba	1.20 ba	100.00 a	6.20 bac	60.00 ba	2.30 ba	0.53 a	0.05 a
T7	0.70 c	1.40 ba	1.20 ba	100.00 a	6.64 ba	60.00 ba	2.10 bac	0.50 a	0.05 a
T8	1.00 bc	1.80 a	1.80 a	100.00 a	7.37 a	60.00 ba	2.20 bac	0.50 a	0.06 a
T9	2.10 a	1.30 ba	0.90 ba	10.00 c	0.31 e	50.00 ba	1.70 bac	0.16 d	0.01 c
T10	0.80 c	1.30 ba	0.80 c	10.00 c	0.48 e	70.00 a	1.90 bac	0.19 d	0.02 c
T11	1.80 ba	1.20 ba	0.50 c	20.00 c	0.83 e	40.00 bac	2.60 a	0.33 bdac	0.03 cb
<b>C V</b>	80.43	65.02	98.48	21.32	61.56	81.47	184.31	29.85	80.43

Medias (n=10) con la misma letra en cada columna significa que son estadísticamente iguales (Duncan, 0.05); C V: Coeficiente de variación; **A:** Yemas axilares de 2-5 mm de longitud; **B:** Yemas axilares con hojas mayor a 5 mm de longitud; **C:** Brote axilar con tallo mayor a 2 mm de longitud; **D:** Porcentaje de micro estacas que desarrollaron callo; **E:** Diámetro de callo en mm; **F:** Porcentaje de plantas que desarrollaron raíz; **G:** Número de raíces por explante; **H:** Peso fresco en g; **I:** Peso seco en g.

Cuadro 7. Tipo de injerto entre CM-334 y *Capsicum pubescens* y tipo de medio semisólido con o sin hormonas para promover mayor cicatrización del injerto *in vitro*

Tipo de injerto	Variables		Tratamientos	Variables en %			
	P	LdC (mm)		P	CSN	CCN	CR
Diagonal	90	2.41 en $\bar{X}$	T1	70	0	100	0
Trasversal	70	1.21 en $\bar{X}$	T2	100	100	0	0
			T3	100	100	0	90

P: Porcentaje de prendimiento; LdC: Longitud de corte entre tallos. CSN: Cicatrización sin necrosis; CCN: Cicatrización con necrosis; CR: Portainjerto con raíz

Toruan *et al.* (2008) al evaluar diferentes tipos de injerto *in vitro* entre especies género *Aquilaria*, observaron mayor éxito de la unión cuando utilizaron el injerto de tipo cuña, debido a que este propició una mayor superficie de contacto y permitió mejor punto de apoyo para la cicatrización. Desde que se tiene conocimiento de la interacción hormonal entre el injerto y portainjerto, se han evaluado varias hormonas para aumentar el prendimiento, por ejemplo Köse y Güleriyüz (2006) demostraron que aplicaciones de BA a los tallos de vid aumentó la formación de callo entre portainjerto e injerto en condiciones *in vivo*. Por otro lado, Parkinson y Yeoman (1982) demostraron que aplicaciones de AIB al medio de cultivo favoreció el prendimiento al efectuar injertos *in vitro* de *Lycopersicon esculentum*, *Datura estramonium* y *Nicandra physaloides*.



Figura 1. A: Injerto transversal mostrando cicatrización parcial; B: Injerto diagonal o de lengüeta; C: Injerto en medio MS mostrando oxidación en zona de unión y portainjerto; D: Necrosis de la región central del tallo del portainjerto CM-334; E: Injertos en medio AA+BA sin oxidación y mejor cicatrización; F: Injerto en medio AA con mayor desarrollo de raíces y buen prendimiento.

### Crecimiento y enraizamiento *in vitro* del injerto

Para las variables, crecimiento del injerto, número de hojas y diámetro de tallo injerto-portainjerto ( $p \leq 0.05$ ), el mejor tratamiento fue el T4, que contenía ANA+BA (0.01, 0.1) mg L<sup>-1</sup>+ TRIA (10 µg L<sup>-1</sup>). No obstante este mismo tratamiento fue el mejor en promover el crecimiento de raíces en el portainjerto aunque estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) igual a T1 (ANA+BA en 0.01 y 0.1 mg L<sup>-1</sup>). Estos dos tratamientos resultaron diferentes ( $p \leq 0.05$ ) a los demás tratamientos que contenían hormonas. Un aspecto importante a resaltar es la formación de callo en la base del portainjerto, con los tratamientos 1, 2, 3, y 4, los estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) aumentaron tamaño al incrementar la concentración de TRA en MS suplementado con ANA+BA.

Cuadro 8. Comparación de medias de las variables usadas para determinar medio más apropiado para crecimiento *in vitro* del injerto de *Capsicum pubescens*.

Trat	Injerto			portainjerto			
	A	B	C	D	E	F	G
T0	14.82 c	1.3 c	1.42 c	1.80 b	1.13 b	5.13 c	0.00 d
T1	54.23 b	5.4 ba	1.95 ba	2.01 ba	8.88 a	64.50 a	0.13 cd
T2	40.19 cb	3.4 bc	1.69 bac	1.83 b	5.25 ba	35.25 bac	0.50 b
T3	24.66 cb	3.0 c	1.56 bc	1.71 b	3.00 b	38.38 bac	0.88 a
T4	84.41 a	6.0 a	2.11 a	2.35 a	9.38 a	51.13 ba	0.38 cb
T5	32.36 cb	2.8 c	1.66 bac	1.78 b	2.25 b	30.63 bac	0.00 d
T6	35.18 cb	3.4 bc	1.55 bc	1.81 b	2.81 b	26.88 bc	0.00 d
<b>C V</b>	76.61	64.90	64.90	23.91	113.90	99.78	133.11

Medias (n=8) con la misma letra en cada columna significa que son estadísticamente iguales (Duncan, 0.05): **C V**: Coeficiente de variación; **A**: Longitud de tallo de injerto en mm, **B**: Número de hojas del injerto, **C**: Diámetro de tallo de injerto en mm, **D**: Diámetro de tallo de portainjerto en mm, **E**: Número de raíces de portainjerto, **F**: Longitud de raíz en mm. **G**: Callo.

Análogo al cultivo de tejido, en el injerto *in vitro* también se requieren reguladores de crecimiento para estimular un buen desarrollo necesario para la mejor la aclimatación. Las auxinas y citocininas son sinérgicamente requeridos para inducir la división celular y el crecimiento en cultivo de tejidos de plantas. Sin embargo, la elongación de los brotes ha sido uno de los mayores obstáculos para obtener plantas completas en cultivo *in vitro* de chiles (Valera y Ochoa, 1992; Steinitz *et al.*, 1999, Mezghani *et al.*, 2007; Otroshi y Grehsaren, 2013). En algunos casos, se ha superado ha sido superado al transferir los brotes a un medio suplementado con BAP+GA<sub>3</sub> (Joshi y Kothari 2007), BAP+AIB (Otroshi *et al.*, 2011a), AG (Arous *et al.*, 2001) y AG<sub>3</sub>+PG (Bairwa, 2012); mientras que para enraizamiento se ha usado medio MS con AIB (Bairwa *et al* 2013) ANA (Hyde y Phillips, 1996; Franck *et al.*, 1998) y AIA (Joshi y Kothari, 2007). En nuestro experimento el crecimiento del injerto y enraizamiento del patrón se obtuvo en un medio MS con ANA+BA (0.01 y 0.1 mg L<sup>-1</sup>), respuesta que fue potencializado con la adición de TRIA (10 µg L<sup>-1</sup>). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Reddy *et al.* (2002), quienes reportaron que la adición de 2 y 5 µg L<sup>-1</sup> de TRIA al medio MS base con AIB+BA, favoreció la elongación de los brotes e incrementó el número y longitud de las raíces en explantes de *Capsicum frutescens*, respuesta que no aumentó con incrementos en la concentración de TRIA en el medio MS. De manera similar, Tantos *et al.* (1999), mencionan que el crecimiento de brotes de *Melissa officinalis* L. fue proporcional al aumentar la concentración de TRIA en un MS base con BA+AIA (1.0 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>), pero no para el número de raíces, el cual fue mayor con 2 µg L<sup>-1</sup> de TRIA, y disminuyó con aumentos en la concentración de TRIA, sin embargo, su longitud aumentó a partir de 10 µg L<sup>-1</sup>. Quizá la adición de 2 y 5 µg L<sup>-1</sup> de TRIA al MS usado en este experimento actuó como antagonico al efecto de ANA+BA sobre el injerto de *Capsicum pubescens* y portainjerto CM-334, resultado que se reprodujo en MS con 5 y 10 µg L<sup>-1</sup> sin ANA+BA. No obstante, el crecimiento del injerto, el número y longitud de las raíces en el portainjerto fue mayor a la concentración más alta de TRIA en MS con ANA+BA.

## **Aclimatación del injerto**

De un total 48 injertos obtenidos de la fase de crecimiento y enraizamiento, al finalizar el periodo de aclimatación, el 56 % sobrevivieron. Sin embargo, al comparar los porcentajes de injertos aclimatado entre tratamientos de la fase de crecimiento y enraizamiento, estos no coincidieron con el tratamiento (T4, Cuadro 8) en que los injertos crecieron mejor y desarrollaron más raíces (MS con ANA+BA (0.01+ 0.1 en mg L<sup>-1</sup>)+ TRIA (10 µg L<sup>-1</sup>)). No obstante con ( $p \leq 0.05$ ) si hubo un efecto cuando las plantas presentaron al menos una raíz (Cuadro 9). Las plantas que presentaron de una a nueve raíces, fueron las que mejor respondieron al proceso de aclimatación que las no desarrollaron ninguna.

El proceso de aclimatación de plantas de chiles obtenidas *in vitro* involucra un breve periodo de endurecimiento y aclimatación (Frank *et al.*, 1998; Sobhakumari y Lalithakumari, 2003; Joshi y Kothari, 2007; Bairwa *et al.*, 2012; Otroshi *et al.*, 2013). El cual consiste extraer los explantes enraizado del frasco, se siembran en un sustrato determinado y se mantienen en una cámara húmeda y a una temperatura constante por dos semanas, tiempo en el que se reduce la humedad de manera progresiva (Otroshy *et al.* 2011b; Otroshy *et al.*, 2013). La sobrevivencia de las plantas durante la aclimatación hasta su establecimiento puede variar de 60 a 80% (Cristopher y Rajam, 1996; Peddaboina *et al.*, 2006 y Otroshy *et al.* 2011a) y en algunos casos hasta del 90% (Kehie *et al.*, 2012). El proceso de aclimatación que desarrollamos, en principio fue similar a lo reportado y con resultados en sobrevivencia semejantes.

El proceso de aclimatación de plantas de chiles obtenidas *in vitro* involucra un breve periodo de endurecimiento y aclimatación (Frank *et al.*, 1998; Sobhakumari y Lalithakumari, 2003; Joshi y Kothari, 2007; Bairwa *et al.*, 2012; Otroshi *et al.*, 2013). El cual consiste extraer los explantes enraizado del frasco, se siembran en un sustrato determinado y se mantienen en una cámara húmeda y a una temperatura constante por dos semanas, tiempo en el que se reduce la humedad de manera progresiva (Otroshy *et al.* 2011b; Otroshy *et al.*, 2013). La sobrevivencia de las plantas durante la aclimatación hasta su establecimiento puede variar de 60 a 80% (Cristopher y Rajam, 1996; Peddaboina *et al.*,

2006 y *Otroshy* et al 2011a) y en algunos casos hasta del 90% (Kehie *et al.*, 2012). El proceso de aclimatación que desarrollamos, en principio fue similar a lo reportado y con resultados en sobrevivencia semejantes.

Cuadro 9. Comparación de la sobrevivencia a la aclimatación de plantas injertadas de *C. pubescens* con y sin raíz.

Tratamiento	Aclimatadas	Formación radical	Aclimatadas
T2	75 % a		
T1	63 % a	Con raíz	71 % a
T6	63 % a		
T3	50 % a	Sin raíz	7% b
T4	50 %ba		
T5	38 %ba		
C V (n=8)	108.96	C V (n=48)	81.50

Medias con la misma letra en cada columna significa que son estadísticamente iguales (Duncan, 0.05); C V: Coeficiente de variación.

### **Evidenciando la resistencia del injerto a *Phytophthora capsici***

En condiciones de invernadero, un total de 36 injerto aclimatados fueron inoculados en con  $3 \times 10^5$  zoosporas de *P. capsici*. Sobrevivieron el 94 % (34 injertos) y murieron dos mostrando los síntomas típicos de marchitez, los cuales, después evaluar avance de la infección por *P. capsici* a través de sus tallo, se encontró que en el primer injerto, no hubo desarrollo de esporangios a lo largo del tallo mientras que, en el segundo injerto, solo en el tallo de *C. pubescens* se observó la presencia de esporangios, hasta seis centímetros después del sitio de avance de la infección. Posiblemente se infectó por salpicadura de agua al momento del riego. Las plantas de chile manzano sin injertar, mostraron los síntomas de marchitez a las 48 horas, muriendo el total a los cinco días. En la variedad Yolo Wonder, se observaron los síntomas cuatro días después de la inoculación, a los siete todas las plantas mostraron marchitez y muerte de las mismas a los 11. Ninguna planta del chile Criollo de Morelos 334 mostró síntoma de marchitez verificando su resistencia a *P. capsici*. Cuadro

10. Estos resultados demuestran que CM-334 es potencialmente apto de ser usado como porta injerto de chile manzano (*Capsicum pubescens*).

De evaluaciones sobre el uso de CM-334 como portainjerto de chile Jalapeño, Chilaca y Cayene (*Capsicum annuum* L.), Osana *et al.* (2012) reportaron un 90 % de prendimiento en pruebas de injerto *in vivo* entre los genotipos mencionados. A su vez, García *et al.* (2010), demostraron la funcionalidad del injerto chile ancho variedad Rebelde sobre Criollo de Morelos para el control de *Phytophthora capsici*. Por otro lado, cuando no se dispone de especies resistentes del mismo género al que pertenece la variedad de interés, es posible el uso de especies de la misma familia botánica como portainjerto. Así lo demostraron Ives *et al.* (2012) al obtener un 100 % de prendimiento al injertar *Capsicum chinense* Jacq cv Scotch Bonnet sobre *Solanum melongena* cv Black Beauty resistente a condiciones de alta salinidad.

Cuadro 10. Comparación de medias de % de sobrevivencia a *Phytophthora capsici* de las especies tratadas.

	Sobreviencia <sup>a</sup>	Mortalidad
<i>Capsicum annuum</i> L (CM-334)	100.00 a	0 de 36
<i>Capsicum pubescens</i> R & P/ <i>C. annuum</i>	94.44 b	2 de 36
<i>Capsicum pubescens</i> R & P	0.00 c	36 de 36
<i>Capsicum annuum</i> L var Yolo Wonder	0.00 c	36 de 36
C V	10.50	

<sup>a</sup> Medias (n=36) con la misma letra en columna son estadísticamente igual (Tukey, 0.05); C

V: Coeficiente de variación

## CONCLUSIONES

Se demostró la compatibilidad para el injerto *in vitro* entre plantas del Criollo de Morelos 334 (*Capsicum annuum* L) y las plantas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P). Con base a los resultados obtenidos, es factible el uso de CM-334 como porta injerto de *Capsicum pubescens* para reducir la incidencia de la marchitez causado por *Phytophthora capsici* en sistemas de producción de esta hortaliza.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, R., V. H. T. Corona, P. López, M. Latournerie, M. Ramírez, H. Villalón and J. A. Aguilar. 2010.** Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco. Edo de México. 114 p
- Ahmad, N., I. Siddique and M. Anis. 2006.** Improved plant regeneration in *Capsicum annuum* L. from nodal segments. *Biologia Plantarum* 50: 701 – 704.
- Arous S., M. Boussaïd y M. Marrakchi. 2001.** Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Applied Horticulture* 3: 17 – 22.
- Bairwa, V. K., S. Kachhwaha and S. Kothari. 2012.** Phloroglucinol mediated shoot bud elongation in *Capsicum annuum* L. *National Academy Science Letters* 35: 331 – 335.
- Boslan, P. W. and E. J. Votava. 2000.** Peppers: vegetable a spice capsicum. *Crop Production Science in Horticulture* 12. CABI Publishing.
- Castellón, M. E., J. L. Chávez, J. C. Carrillo and A. M. Vera. 2012.** Preferencias de consumo de chiles (*Capsicum annuum* L) nativos en los Valles Centrales de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 27 – 35.
- Cristopher, T. and M. V Rajam. 1996.** The effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46: 245 – 250.
- Christopher, T. and M. V. Rajam. 1994.** In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 25 – 29.
- Eshbaugh, W. H. 2012.** The taxonomy of the genus *Capsicum*. *In: Peppers: botany production and uses*. Vincent M. Russo (Ed) London, UK. Ed.CABI pp: 14 – 28.
- Eshbaugh, W. H. 1976.** Genetic and biochemical systematic studies of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102:396-403.
- Estrada, L., A. A. F. T. Davies Jr and J. N. Egilla. 2001.** Physiological changes and grown of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization an post acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 17-24

- Fari, M. and M. Czakó. 1981.** Relationship between position and morphogenetic responses of pepper hypocotyl explants cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 15: 207-213.
- Franck, D. M., Y. Wang, S. Ben and R. N. Beachy. 1998.** In vitro elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53:79-84
- García, R. M. R., E. Chiquito, P. D. Loeza, H. Godoy, E. Villordo, J. L. Pons, M. M. González and J. L. Anaya. 2010.** Producción de chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44: 701-709.
- Glosier, B. R., E. A. Ogundiwi, G. S. Sidhu and D. R. Sischo. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30
- Grzegorzczak, I., I. Bilichowski, E. Mikiciuk and H. Wysokisnka. 2006.** The effect of triacontanol on shoot multiplication and production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 75: 11-15
- Hartmann, H. T., D. E. Kester and F. T. Davies Jr. 2010.** Hartmann & Kester's plant propagation, principles and practices. 8<sup>th</sup> ed. Ed. Prentice Hall. U.S.A. pp: 416-463.
- Himabindu, K. B., M. S. Priya, D. M. Reddy, P. Sudhakar, Y. Srinivasulu, M. Reddisekhar, P. Latha and B. R. Kumar. 2011.** Studies on the effect of various sterilants and culture conditions on in-vitro seed germination in tomato (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 3: 476 – 480.
- Hulvey, J., O. Hurtado, L. Aragón, D. Gobena, D. Storey, L. Finley and K. Lamour. 2011.** Genetic Diversity of the Pepper Pathogen *Phytophthora capsici* on Farms in the Amazonian High Jungle of Peru. *American Journal of Plant Sciences* 2: 461 – 466.
- Hurtado, G. O., L. Aragon, W. Apaza, R. Donahoo and K. Lamour. 2008.** Survival and Spread of *Phytophthora capsici* in Coastal Peru. *Phytopathology* 98: 688 – 694.
- Hyde, C. J. and G. C Phillips. 1996.** Silver nitrate shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro - Plant* 32: 72 – 80.

- Ives, L., R. Brathwaite, G. Barclay, W. A. Isaac, C. Bowen-O'Connor and I. Bekele. 2012.** Graft Compatibility of scotch bonnet (*Capsicum chinense* Jacq) with selected salt-tolerant Solanaceous. Journal of Agricultural Science and Technology B2: 81 – 92.
- Joshi, A. and S. L. Kothari. 2007.** High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 127 – 133.
- Kehie, M., S. Kumaria and P. Tandon. 2012.** *In vitro* plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili. Biotech 2: 31 – 35.
- King, S. R., A. R. Davis, X. Zhang and K. Crosby. 2010.** Genetics, breeding and selection of rootstocks for Solanaceae and Cucurbitaceae. Scientia Horticulturae 127: 106 – 111.
- Köse, C. and M. Güleriyüz. 2006.** Effects of auxins and cytokinins on graft union of grapevine (*Vitis vinifera*), New Zealand. Journal of Crop and Horticultural Science 34: 145 – 150.
- Kumar, B. S. and A. Krishna. 2003.** *Capsicum*: historical a botanical perspective. In: *Capsicum: the genus Capsicum*. Amit Krishna De (ed). Canada and USA. Ed. Taylor and Francis. pp: 1 – 15.
- Mezghani, N., A. Jemmali, N. Elloumi, R. Gargouri-Bouزيد and S. Kintzioz. 2007.** Morpho-histological study and shoot bud regeneration in cotyledon cultures of pepper (*Capsicum annuum*). Biologia 62: 704 – 710.
- Moneruzzaman, K. M., G. Faruq, M. Motior, M. Sofian-Azirun and A. Nasrulhaq. 2013.** The influence of 1-triacontanol on the growth, flowering, and quality of potted bougainvillea plants (*Bougainvillea glabra* var. “Elizabeth Angus”) under natural conditions. The Scientific World Journal 2013:1 – 12.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiological Plant 15: 473 – 497.
- Nuez, F., R. Ortegale y J. Costa. 1996.** El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi-Prensa. España.

- Ochoa, A. N. and L. Ireta M. 1994.** Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 42: 21 – 28.
- Otroshy, M. and N. M. Ghehsareh. 2013.** The effect of plant growth regulators and different type of explants on organogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) in *in vitro*. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 3: 271 – 278.
- Otroshy, M., K. Moradi, M. K. Nekouei and P. C. Struik. 2011a.** Micropropagation of pepper (*Capsicum annuum* L.) through in vitro direct organogenesis. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 38 – 45.
- Otroshy, M., K. Moradi and M. K. Nekouei. 2011b.** The effect of different cytokenins in propagation of *Capsicum annuum* L. by *in vitro* nodal cutting. *Trakia Journal of Sciences* 9: 21 – 30.
- Parkinson, M. and M. M. Yeoman. 1982.** Graft formation in cultured explanted internode. *New Phytologist* 91: 711 – 19.
- Peddaboina, V., C. Thamidala and S. Karampuri. 2006.** *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. *Scientia Horticulturae* 107: 117 -122.
- Pérez, G. M., V. A. González, M. C. Mendoza, C. Peña, A. Peña and J. Sahagún. 2004.** Physiological Characterization of Manzano Hot Pepper (*Capsicum pubescens* R & T) landraces. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129: 88 – 92.
- Pérez, G. M. and B. R. Castro. 2008.** El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo. 128 pp.
- Qi, R., T. Wang, W. Zhao, P. Li, J. Ding and Z. Gao. 2012.** Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to metalaxyl. *Journal of Phytopathology* 160: 717 – 722.
- Reddy, B. O., P. Giridhar and G. A. Ravishankar. 2002.** The effect of Triacontanol on micropropagation of *Capsicum frutescens* and *Decalepis hamiltonii* W&A. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 253 – 258.
- Redondo, J. E. 1979.** Búsqueda de genotipos resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México. *Proceedings of the Tropical Region. American Society for Horticultural Science.* 23:220-224.

- Rick, C. M. 1950.** *Capsicum pubescens*, a little know pungent pepper from Latin America. Missouri Botanical Gardens Bulletin 38: 36 – 42.
- Roca, W. M. and L. L. A. Mroginski. 1991.** Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos Y aplicaciones. Cali, Colombia: Centro International de Agricultura Tropical (CIAT).
- Rodríguez, L. A. 2005.** Preferencias del consumidor por el chile piquín en comparación con otros chiles en el Noroeste de México. Revista Chapingo Serie Horticultura 11: 279 – 281.
- Siddique, I. and M. Anis. 2006.** Thidiazuron induced high frequency shoot bud formation and plant regeneration from cotyledonary node explants of *Capsicum annuum* L. Indian Journal of Biotechnology 5: 303-308
- Sobhakumari, V. P. and D. Lalithakumari. 2003.** Direct plant regeneration from shoot tip cultures of *Capsicum annuum* L. cv. PLR-1. Phytomorfology 53: 235 – 242.
- Song, J. Y., I. Sivanesan, C. G. An and B. R. Jeong. 2010.** Adventitious shoot regeneration from leaf explants of miniature paprika (*Capsicum annuum*) ‘Hivita Red’ and ‘Hivita Yellow’. African Journal of Biotechnology 9: 2768 – 2773.
- Steinitz, B., D. Wolf, T. Matzevitch-Josef and A. Zelcer. 1999.** Regeneration in vitro and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.): the current state of the art. Capsicum and Eggplant Newsletter 18: 9 – 15.
- Tantos, A., A. Mészáros and J. Kissimon. 1999.** The effect of triacontanol on micropropagation of balm, *Melissa officinalis* L. Plant Cell Report 19: 88 – 91.
- Toruan-Mathius, N., J. Situmorang and D. Rachmawati. 2008.** Compatibility studies of interspecific *In vitro* micrografting of agarwood (*Aquilaria malaccensis* LAMK.). Biotropia 15: 95 – 109.
- Valera, M. L. L. and N. Ochoa. 1992.** A novel approach for chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. Plant Science 84: 215 – 219.
- Yeon, S. J., I. Sivanesan, C. Geon and B. Ryong. 2010.** Adventitious shoot regeneration from leaf explants of miniature paprika (*Capsicum annuum*) ‘Hivita Red’ and ‘Hivita Yellow’. African Journal of Biotechnology 9: 2768 – 2773.

**Zijlstra, S., C. Purimahua and P. Lindhout. 1991.** Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. HortScience 26: 585 – 586.