



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

## CINÉTICA DEL DESARROLLO DE CARACTERES FISIOLÓGICOS DURANTE LA MADUREZ DE LA SEMILLA DE *Capsicum annuum* L.

MARCELO MARTÍNEZ MUÑOZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada “**Cinética del desarrollo de caracteres fisiológicos durante la madurez de la semilla de *Capsicum annuum* L.**”, realizada por el alumno Marcelo Martínez Muñoz, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

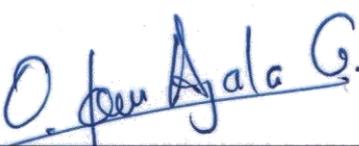
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. OSCAR JAVIER AYALA GARAY

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. TARSICIO CORONA TORRES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2014

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

A **Dios** por todo lo que me ha dado y permitirme llegar hasta donde estoy ahora.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para adquirir este grado académico.

Al **Colegio de Postgraduados** por haberme dado la oportunidad de formarme en sus instalaciones.

Al **Dr. Oscar Javier Ayala Garay** por contribuir en mi proceso educativo, y por su tiempo, apoyo, sugerencias y paciencia para la realización de la investigación.

Al **Dr. Heber Aguilar Rincón** porque me compartió su conocimiento sobre el cultivo de chile y así formó parte fundamental de esta investigación.

Al Dr. **Tarsicio Corona Torres** por haber sido parte del equipo de este trabajo y haber aportado para el desarrollo del mismo.

Al Dr. **Víctor Conde Martínez** y a la **M.C. Sabina Velázquez Márquez** por colaborar en diferentes aspectos durante el desarrollo de esta tesis.

A la **Sra. Alicia** por su apoyo en la realización de múltiples tramites durante mi estancia en el Colegio.

Al personal de laboratorios, **Barbará y Juan** y al **Sr. Barrales y Toribio** en el campo experimental, a **Felipe y Víctor** por el apoyo para llevar a buen término esta investigación.

Al equipo **RENDIR**: Jesús, Nancy, Nohemí, Xochil, Miguel, Eladio, José Luis, en especial al Ing. Daniel Días, por el apoyo, tiempo y confianza.

## DEDICATORIA

A mis padres, **Sr. Luis Martínez Trejo** y **Tomasa Muños González** por darme la vida, por sus sabios consejos, por su apoyo en todo momento, por el gran esfuerzo y sacrificio que han hecho, por hacer de cada uno de sus hijos mejores personas. Infinitamente gracias.

A **Alejandra** por el apoyo, motivación y comprensión en la vida. “Gracias Ale”

A mis **hermanos** por ser un pilar insustentable y fuente de motivación en mi vida. Gracias por el apoyo que siempre me han brindado.

A mi hermana **Susana Martínez Muñoz** por su esfuerzo, apoyo y consejos que siempre me has brindado y con el cual he logrado realizar una metas más en mi vida.

A mis tíos **Miguel, Valeria, Francisco**, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

A mi Abuelo **Milesio Muñoz Olguín**<sup>†</sup>, por sus sabios consejos, e inculcarme el deseo de superación muchas gracias donde te encuentres

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE CUADROS .....                                      | viii |
| LISTA DE FIGURAS .....                                      | ix   |
| RESUMEN.....  | xii  |
| SUMMARY .....   | xiii |
| I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....                               | 1    |
| II. OBJETIVO GENERAL .....                                  | 4    |
| 2.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....                            | 4    |
| III. REVISIÓN DE LITERATURA.....                            | 5    |
| 3.1 Importancia del Cultivo .....                           | 5    |
| 3.2 Producción de Chile en México.....                      | 5    |
| 3.3 Descripción Botánica del Género <i>Capsicum</i> .....   | 6    |
| 3.4 Taxonomía.....  | 7    |
| 3.5 Tipos de Chile.....                                     | 8    |
| 3.6 Calidad de las Semillas.....                            | 10   |
| 3.7 Las Semillas de Chile .....                             | 11   |
| 3.8 Desarrollo de las Semillas .....                        | 12   |
| 3.8.1 Proteínas LEA.....                                    | 15   |
| 3.9 Madurez del Fruto y Extracción de Semilla de chile..... | 18   |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....                              | 22   |
| 4.1 Localización del Sitio Experimental.....                | 22   |
| 4.2 Manejo del Experimento .....                            | 22   |
| 4.3 Factores y Niveles de Estudio .....                     | 22   |

|  |    |
|--|----|
| 4.4 Variables Respuesta.....   | 24 |
| 4.4.1 Contenido de humedad de la semilla (H, %) .....                                      | 24 |
| 4.4.2 Peso de 1000 semillas (P1000S, g) .....  | 24 |
| 4.2.3 Peso volumétrico (PV, kg hL <sup>-1</sup> ) .....                                    | 25 |
| 4.2.4 Prueba de germinación (G, %) y velocidad de emergencia de radícula (VR) .....        | 25 |
| 4.2.5 Germinación posterior al envejecimiento acelerado (G-EA, %) .....                    | 26 |
| 4.2.6 Conductividad eléctrica (CE, $\mu\text{S cm}^1 \text{ g}^{-1}$ ) .....               | 26 |
| 4.2.7 Diseño experimental y análisis estadístico .....                                     | 27 |
| 4.2.8 Actividad de proteínas LEA.....  | 27 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 29 |
| 5.1 Contenido de Humedad .....   | 29 |
| 5.1.1 Contenido de humedad en semillas recién extraídas .....                              | 29 |
| 5.1.2 Contenido de humedad en semillas secadas por 15 d en condiciones de laboratorio. ... | 31 |
| 5.2 Peso de 1000 Semillas y Peso Volumétrico .....   | 32 |
| 5.3 Germinación .....  | 36 |
| 5.4 Vigor .....  | 40 |
| 5.4.1 Velocidad de emergencia de radícula .....  | 40 |
| 5.4.2 Germinación posterior a envejecimiento acelerado .....                               | 42 |
| 5.5 Conductividad eléctrica .....  | 43 |
| 5.6 Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) .....                                      | 45 |
| V. DISCUSIÓN GENERAL.....  | 49 |
| VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....   | 52 |
| 6.1 Conclusiones.....  | 52 |
| 6.2 Perspectivas .....   | 53 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| VII. LITERATURA CITADA .....         | 55 |
| VIII. ANEXOS .....                   | 64 |
| 7.1 Conducción del Experimento. .... | 64 |

## **LISTA DE CUADROS**

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Factores y niveles de estudio en el experimento. ....  | 23 |
| Cuadro 2. Grados de libertad, cuadrados medios y significancia estadística en los análisis de la<br>varianza de la variable de calidad física peso de 1000 semillas..... | 33 |
| Cuadro 3. Grados de libertad, cuadrados medios y significancia estadística en los análisis de la<br>varianza de las variables de calidad fisiológica de semillas.....    | 37 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Chile Ancho a) inmaduro y b) maduro. ....8
- Figura 2. Chile Guajillo a) inmaduro y b) maduro.....9
- Figura 3. Contenido de humedad de semilla recién extraída en frutos de dos tipos de chile (A: Ancho y B: Guajillo) cosechadas en seis etapas de desarrollo y tres períodos de postcosecha del fruto: -◆- 0 días después del corte (DDC), -■- 7 DDC y -▲- 14 DDC. Las barras horizontales representan la desviación estándar. ....30
- Figura 4. Contenido de humedad de semilla secada durante 15 d en condiciones de temperatura ambiente ( $18 \pm 1$  °C) de dos tipos de chile (A: Ancho y B: Guajillo) cosechadas en seis fases de desarrollo: -◆- 40 días después de anthesis (DDA), -■- 60 DDA, -▲- 80 DDA, -✕- 100 DDA, -✱- 120 DDA, -◆- 140 DDA y tres periodos de conservación postcosecha del fruto: 0, 7 y 14 días después del corte. Las barras horizontales representan la desviación estándar. ....32
- Figura 5. Evolución del peso de mil semillas y volumétrico en chile Ancho (A y C, respectivamente) y Guajillo (B y D, respectivamente) cosechadas en seis etapas de desarrollo y tres períodos de postcosecha del fruto: -◆- 0 días después del corte (DDC), -■- 7 DDC y -▲- 14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las barras horizontales representan la desviación estándar.....35
- Figura 6. Evolución de la germinación de la semilla en chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y tres periodos de almacenamiento postcosecha del fruto: -◆- 0 días después del corte (DDC), -■- 7 DDC y -▲- 14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ....38

Figura 7.1 Comparación de la germinación de semillas de chile Ancho  $\blacklozenge$  y Guajillo  $\blacksquare$  provenientes de frutos almacenados durante: 0, 7 y 14 días después del corte (DDC). Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). .....39

Figura 8. Evolución de la velocidad de emergencia de radícula en chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y tres periodos de almacenamiento postcosecha del fruto:  $\blacklozenge$  0 días después del corte (DDC),  $\blacksquare$  7 DDC y  $\blacktriangle$  14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). .....41

Figura 9. Evolución de la germinación posterior al envejecimiento acelerado en chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y tres periodos de almacenamiento postcosecha del fruto:  $\blacklozenge$  0 días después del corte (DDC),  $\blacksquare$  7 DDC y  $\blacktriangle$  14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). .....42

Figura 10. Cinética de la conductividad eléctrica de semillas de chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y en tres épocas de conservación postcosecha de fruto  $\blacklozenge$  0 días después del corte (DDC),  $\blacksquare$  7 DDC y  $\blacktriangle$  14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). .....44

Figura 11. Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión de chile Ancho (A) y Guajillo (B) los embriones fueron extraídos de la semilla con 60, 80, 100, 120 y 140 DDA en frutos sin almacenamiento postcosecha 0 DDC. ....47

Figura 12. Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión de chile Ancho (A) y Guajillo (B) los embriones fueron extraídos de la semilla con 60, 80, 100, 120 y 140 DDA de frutos sin almacenamiento postcosecha 0 DDC y 140 d de almacenamiento postcosecha. ....48

Figura 13 Conducción del experimento en invernadero .....64

Figura 14 Flores en antesis.....64

|   |    |
|---|----|
| Figura 15. Fruto etiquetado .....   | 65 |
| Figura 16 Extracción se semillas.....   | 65 |
| Figura 17 Embriones extraídos .....   | 65 |
| Figura 18. Semillas germinadas .....  | 66 |
| Figura 19 Materiales de conductividad eléctrica.....  | 66 |
| Figura 20 Envejecimiento acelerado .....  | 67 |
| Figura 21 Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión..... | 67 |

# CINÉTICA DEL DESARROLLO DE CARACTERES FISIOLÓGICOS DURANTE LA MADUREZ DE LA SEMILLA DE *Capsicum annuum* L.

Marcelo Martínez Muñoz, M.C  
Colegio de Postgraduados, 2014

## RESUMEN

El uso de semilla de alta calidad es de gran importancia en la agricultura moderna. Existen escasos estudios sobre el desarrollo de la semilla de variedades mexicanas de chile (*Capsicum annuum* L.). El estudio se realizó en 2012-2013 para conocer las particularidades del desarrollo de la semilla en chile Ancho y Guajillo e identificar la etapa de cosecha más apropiada. En condiciones de invernadero en Texcoco, México, se estudió la evolución de la calidad física y fisiológica de semillas obtenidas de frutos cosechados a 40, 60, 80, 100, 120, y 140 d después de antesis (DDA). Con extracción de semilla a 0, 7 y 14 d después del corte (DDC). El contenido de humedad de la semilla fresca (0 DDC) de Guajillo disminuye durante todo el desarrollo al pasar de 86 a 17 % y en Ancho se mantiene en 47 % a partir de los 100 DDA. De manera general, el valor máximo de peso de semilla se observó a 80 DDA, de germinación a 100 DDA y de vigor a 120 DDA. La extracción de semilla de frutos con 14 DDC mejoró significativamente su calidad fisiológica, pues en frutos cosechados a 80 DDA se encontró una germinación mayor a 93 % comparado con 5 % a 0 DDC. Se detectó la actividad de dos proteínas LEA (50 y 65 kDa) correlacionadas con los mayores valores de germinación y vigor. La mejor calidad de semillas tanto en chile Ancho y Guajillo se alcanzó en frutos cosechados en 120 DDA.

**Palabras clave:** Almacenamiento postcosecha de frutos, Germinación, Proteínas LEA.

**KINETICS OF DEVELOPMENT OF PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS  
DURING THE MATURITY OF THE SEED OF *Capsicum annuum* L.**

**Marcelo Martínez Muñoz, M.Sc  
Colegio de Postgraduados, 2014**

**SUMMARY**

High quality seed use is of great importance in modern agriculture. There are few studies on the development of the seed of Mexican varieties of pepper (*Capsicum annuum* L.). This investigation was conducted in 2012-2013 to know the peculiarities of seed development in Chile Ancho and Guajillo and identify the most appropriate harvesting stage under greenhouse conditions in Texcoco, Mexico, the evolution of physical and physiological quality of seeds from harvested fruits at 40, 60, 80, 100, 120 and 140 d after anthesis (DAA) were studied. With extraction of seed at 0, 7 and 14 d after cutting (DDC). The moisture content of fresh seed (0 DDC) of Guajillo throughout its development decreases from 86 to 17%, and Ancho maintaining at 47% from 100 DDA. Generally, the maximum seed weight was observed at 80 DAA, germination at 100 DDA and vigor from 120 DDA. The extracted seeds of fruits from 14 DDC improved physiological quality significantly, as in fruit harvested at 80 DDA the germination was found greater than 93% compared to 5% from 0 DDC. The activity of two LEA proteins (50 and 65 kDa) correlated with higher values of germination and vigor it was detected. The best quality seed in both, Ancho and Guajillo was reached in fruits harvested from 120 DAA.

**Keywords:** fruit postharvest storage, germination, LEA proteins.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Entre las plantas cultivadas de importancia mundial se encuentra el chile (*Capsicum* ssp.) como uno de los saborizantes mas importantes en la cocina (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010) y forma parte de los numerosos platillos de la cocina mexicana desde épocas precolombinas, su consumo puede ser en fresco o en seco, sobre todo en forma de salsas y guisados.

El genero *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae*, consiste de cinco especies cultivadas (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. baccatum*) y alrededor de 25 especies silvestres y semicultivadas (Pozo, 1981; Hernández-Verdugo *et al.*, 1999; Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). La domesticación de *C. annuum* ocurrió en México y América Central en donde, de acuerdo a las características del fruto, se encuentra una amplia diversidad de chile en esta especie (Pozo, 1981; Smith *et al.*, 1987; Bosland, 1992; Hernández-Verdugo *et al.*, 1999; Aguilar-Rincón *et al.*, 2010)

*Capsicum annuum* L. es la de mayor importancia entre las especies de chiles cultivados y su distribución es prácticamente en todas las zonas templadas y cálidas del mundo (Nuez *et al.*, 2003). Se disperso en la época colonial; por la extensión de su cultivo y el valor económico que representa su reproducción es la especie cultivada mas importante en todo el mundo (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

La producción se divide en dos modalidades: producción de chiles secos y de chiles frescos o verdes. El mayor productor de chiles verdes es China con 15.5 millones de toneladas, en segundo lugar México con 2.1 millones de toneladas seguido de Turquía con 1.9 millones de toneladas. Los principales países productores de chiles secos en el mundo son: India con 1.4 millones de toneladas anuales; China (282,342 t año<sup>-1</sup>); Pakistán (202,934 t año<sup>-1</sup>); seguidos de Perú, Tailandia, Myanmar, Bangladesh con más de (100,000 t año<sup>-1</sup>); México se encuentra en la doceava posición con una producción media anual de 59,189 t año<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2013).

En México, en el año 2012 los principales chiles secos producidos fueron Guajillo con 34,918 t año<sup>-1</sup>, seguido de Ancho con 21,120 t año<sup>-1</sup>, el rendimiento promedio para Guajillo de 2.28 t ha<sup>-1</sup> y Ancho con 1.73 t ha<sup>-1</sup>. En verde los principales chiles fueron: Jalapeño con 722,889 t año<sup>-1</sup>, Poblano 198,605 t año<sup>-1</sup> y Serrano 189,343.16 t año<sup>-1</sup>. . En cuanto a los estados productores los principales son Chihuahua con 562,166 t año<sup>-1</sup>, Sinaloa 556,463 t año<sup>-1</sup>, Zacatecas 348,833 t año<sup>-1</sup>, y el que presenta el mejor rendimiento es Sinaloa con 37 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2013).

En México, con la gran diversidad de ambientes y climas se han generado diferentes tipos de chile, los cuales son contrastantes en forma, color, olor, sabor, pungencia y en la manera de utilizarse en los distintos platillos. La riqueza genética de chiles en México es muy grande y los estudios a cerca de la fisiología del crecimiento y desarrollo de los mismos, son escasos. La gran mayoría de los estudios realizados en el extranjero en estos temas se han realizado en un solo tipo de chile, el denominado “Sweet Pepper”, cuyas características no representan, lógicamente, la gran diversidad existente en nuestro país. Por ello es necesario estudiar las particularidades de los tipos de chile existentes en México, para mejorar los diversos procesos de producción. La información generada en México sobre el cultivo de chile está enfocada al estudio de biodiversidad, manejo agronómico, morfológico y recursos genéticos. Sin embargo, la variación de los atributos de calidad a lo largo del desarrollo de la semilla, la información existente en esta especie aún es escasa, particularmente la relacionada con el conocimiento de la importancia que tienen algunas características fisiológicas y bioquímicas en el desarrollo de esta, para la obtención de semillas de alta calidad.

El éxito en la producción de los cultivos modernos depende del uso de semilla de calidad. Esto significa que: las semillas deben estar libres de plagas y enfermedades, deben tener viabilidad, un buen desarrollo y una identidad genética (Cervantes, 1967). En cuanto al proceso de producción de semillas de alta calidad, la extracción de la semilla es un aspecto en el cual

también existen contrastes entre los tipos de chile, por ejemplo, en chile Guajillo la extracción se realiza cuando el fruto está seco, mientras que, en el chile Jalapeño cuando el fruto está fresco. Estas diferencias pueden dar origen a diferencias en la calidad de la semilla, puesto que su desarrollo presenta diferencias con el paso del tiempo, en aspectos como madurez del embrión, contenido de inhibidores-activadores de la germinación y en algunos casos rompimiento de latencia.

El desarrollo de la semilla es dependiente de la fijación fotosintética de bióxido de carbono y del transporte de sacarosa, aminoácidos y ácidos orgánicos a este órgano (Bradford y Nonogaki, 2007). Una vez que la semilla alcanza su madurez fisiológica logra una máxima acumulación de reservas, por lo tanto se relaciona directamente con un mayor peso, además de los máximos valores de germinación, velocidad de germinación (vigor) y viabilidad. El transporte de sacarosa, aminoácidos y ácidos orgánicos se detiene e inicia el proceso de adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas.

En semillas ortodoxas, la etapa final de las semillas en desarrollo, se inicia con una reducción natural en el contenido de agua de las semillas, que eventualmente será por debajo de 10 %. Durante esta etapa, los perfiles de proteínas y la expresión de genes cambian; generalmente asociados con el logro de tolerancia a la desecación. Estas proteínas son distintas de las proteínas de almacenamiento se acumulan tardía debido a su acumulación relativamente tarde durante el desarrollo embrionario. Se ha sugerido que las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) están asociadas con tolerancia a la desecación, debido a que son más abundantes durante la embriogénesis tardía que durante la mitad de la embriogénesis (Shih *et al.*, 2008).

En el proceso de producción de semillas de chile existen diversas observaciones empíricas en cuanto al grado de madurez del fruto al momento de la extracción de la semilla. Sin embargo, no

existe suficiente información sistematizada de trabajos de investigación sobre el desarrollo de la semilla y su efecto en la calidad de las semillas.

Con todo lo anterior, la presente tesis tuvo como

## **II. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la cinética del desarrollo de los atributos de calidad física y fisiológica en semillas de Chile Ancho y Guajillo.

### **2.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar los indicadores físicos de humedad y peso de las semillas de Chile Ancho y Guajillo, extraídas en diferentes etapas de desarrollo y con diferentes periodos de almacenamiento postcosecha del fruto.

Evaluar los atributos de calidad fisiológica en esa semilla.

Identificar la actividad de proteínas LEA durante la adquisición de tolerancia a la desecación y su correlación con la capacidad germinativa en esa semilla.

Identificar la mejor época para obtener semillas de alta calidad en Chile Ancho y Guajillo.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Importancia del Cultivo

El cultivo de chile se ha hecho universal, estando presente prácticamente en todas las zonas templadas y cálidas del mundo (Nuez, 2003). Su utilización data desde tiempos remotos, principalmente como condimento, aunque también como una fuente importante de vitamina C, además de diversos usos por parte de las diferentes culturas americanas (Long-Solís, 1986).

Todas las formas de chile utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*, el cual pertenece a la familia Solanaceae. Actualmente se considera que esta familia está formada por unos 90 géneros los cuales están divididas entre 2 subfamilias: Solanoide y Cestroideae. La diferencia entre estas se basa en diferentes modelos de desarrollo del embrión; en Solanoide el embrión esta enrollado y es de un diámetro más o menos uniforme, en la Cestroideae el embrión es típicamente recto o ligeramente curvado. Además, entre estas subfamilias se encuentran gran numero de diferencias morfológicas, químicas y citogenéticas.

#### 3.2 Producción de Chile en México

Del total de variedades producidas, en México existen 22 grupos de chiles verdes, entre los cuales destacan el Jalapeño, el Poblano y el Serrano; y 12 secos. Los chiles verdes, se producen en la mayor parte del año realizándose dos cosechas, la siembra del ciclo otoño-invierno que inicia en diciembre y concluye en agosto y la de primavera- verano que abarca de junio a marzo.

México es exportador de chile verde principalmente del tipo Morrón y exporta tambien chile seco; se exporta principalmente a Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania (SIAP, 2013).

### 3.3 Descripción Botánica del Género *Capsicum*

El chile presenta una raíz pivotante, provista de muchas raíces secundarias largas y fibrosas. Suele profundizar entre 30 y 60 cm y exploración lateral se extiende hasta 50 cm del eje. El sistema radical representa el 7 al 17% del peso total de la planta adulta (Wien, 1999; Nuez *et al.*, 2003).

El tallo es erecto, herbáceo, ramificado y circular a la madurez en la sección media. Puede ser glabro o pubescente y de crecimiento determinado o indeterminado (Valadez, 1993; Nuez *et al.*, 2003).

El número de hojas puede ser controlado por la temperatura y el genotipo, pero generalmente se desarrolla entre 8 y 15 hojas antes de la aparición de la primera flor, y la relación entre el número de hojas y flores es cercano a uno. Las hojas varían en tamaño, forma y color pero la mayoría son simples, enteras y simétricas. (Bosland y Votava, 2000).

La flor típica es pentámera, hermafrodita e hipógina y se encuentra usualmente solitaria en las axilas en *C. annuum*, inicia la floración con una flor en el primer nudo axilar, después la flor se forma en cada nudo adicional, en progresión geométrica (Bosland y Votava, 2000).

El fruto es una baya construida por un pericarpio grueso succulento y un tejido placentario al que se unen las semillas. La pungencia se debe a la presencia de capsaicinoides, cuyo contenido varía desde trazas hasta 0.7 % de la biomasa total del fruto en los tipos más picantes (Nuez *et al.*, 2003). El cambio de coloración se debe a que el contenido de carotenoides aumenta hasta 120 % en el momento de la madurez. El contenido de azúcares también sufre incrementos progresivos hasta la maduración total (Solunkhe, 2003).

### 3.4 Taxonomía

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja, debido a la gran variedad de formas existentes pero son cinco especies principales (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*), las utilizadas por el hombre (Nuez, 2003).

*C. baccatum* es la especie más comúnmente cultivada en América del Sur con distribución en Brasil, Bolivia, Ecuador, Perú y Chile; sus flores son de color crema y presentan puntos amarillos, café o verde oscuro en la corola; los cuales son muy característicos de la especie. *C. frutescens* se encuentra en el sur y centro de América pero se especula que el centro de domesticación fue Panamá y de allí se distribuyó hacia México, el Caribe y algunas regiones de África e India (Antonious *et al.*, 2009). *C. chinense*, es originario de América del sur, donde fue introducido a Cuba, aunque en la isla no se siembra ni se consume, de ahí se cree que fue traído a la Península de Yucatán (Soria, 2002; Ruiz *et al.*, 2011), es la especie más común en el Caribe y posee gran diversidad en Brasil, su principal centro de domesticación. Entre sus principales cualidades se encuentra su extremada pungencia y es el chile habanero uno de sus más importantes representantes (Antonious *et al.*, 2009). *C. pubescens* fue domesticada en los Andes y su mayor distribución se encuentra desde México hasta el Perú; esta especie produce flores purpuras con largos nectarios, y su principal característica es la presencia de pubescencia en las hojas y la coloración oscura de las semillas. Por la superficie de cultivo, popularidad y pungencia, el chile manzano es uno de sus principales exponentes (Bosland y Votava, 2000). *C. annuum* Presenta flores solitarias en cada nudo y los pedicelos a menudo pendientes durante la anthesis, la corola es de color blanco lechoso sin manchas difusas en la base de pétalos. Los pétalos de la corola usualmente son rectos. El cáliz de los frutos maduros sin constricción anular en la unión con el pedicelo y las venas a menudo prolongadas en dientes cortos. La carne del fruto es usualmente firme. Las semillas son de color amarillo (Nuez, 2003; Namesny, 2006).

### 3.5 Tipos de Chile

El chile cultivado se caracteriza por la gran heterogeneidad de formas, sabores, tamaños y colores del fruto, a su vez dicha heterogeneidad puede depender de la región. Los principales tipos de chiles utilizados en México fueron descritos por Laborde y Rendón (1989), aquí se mencionan algunas de las características más sobresalientes de chile Ancho y Guajillo debido a que estos son el centro de interés de esta investigación.

**Ancho.** Es uno de los tipos de chile más importantes en México. Se caracteriza por presentar un fruto de forma triangular o acorazonada, con pericarpio grueso, presenta cajete pronunciado (hundimiento del pericarpio en la unión con el pedicelo), maduran en color rojo marrón. En general los frutos tienen un tamaño promedio de 12 cm de largo, y un Ancho promedio de 6.5 cm. Realizando un corte transversal en el fruto se pueden ver el número de espacios llamados lóculos separados por venas (placenta) que esta del centro del pericarpio (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). Se comercializa tanto en verde (50 %), como deshidratado (Pozo, 1981).



Figura 1. Chile Ancho a) inmaduro y b) maduro.

**Guajillo.** También recibe los nombres de Mirasol y guajon. Es uno de los cuatro chiles más importantes en el país por su volumen de producción. Presenta frutos delgados de 2.0 a 3.5 cm de Ancho y un tamaño de 9 a 14 cm. El pericarpio es delgado y al secarse se torna traslucido. Generalmente los frutos se cosechan cuando están secos, su consumo es principalmente en seco para condimento de distintos platillos en diferentes entidades del país (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

Existen otros tipos de chile que se cultivan en México como el Serrano, manzano, rayado, árbol, piquín, son muy picantes y se consumen principalmente en fresco al igual que procesado.



Figura 2. Chile Guajillo a) inmaduro y b) maduro.

### 3.6 Calidad de las Semillas

Hernández (2012), menciona que una semilla se puede ver afectada por un sinnúmero de factores genéticos, fisiológicos y citológicos, así como patológicos y mecánicos; de este modo, hablar de calidad de semillas implica un conjunto de atributos que contribuyen al establecimiento de la planta en campo, en donde los factores genéticos, sanitarios, físicos y fisiológicos se definen como más importantes ante esto, Doijode (2001) afirma que semillas vigorosas producen plantas fuertes, uniformes y saludables que tienen un mejor desarrollo en su establecimiento y adicionalmente exhiben relativamente una mayor longevidad.

La calidad de la semilla se puede describir como el valor general de la semilla, resultado de las características genéticas y de todos los demás factores que afectan al desarrollo, maduración y capacidad de almacenamiento de la semilla, (OCDE, 2012).

La calidad genética es importante porque garantiza que la semilla genere plántulas con características deseadas; en Chile, la calidad genética garantiza el mantenimiento del rendimiento, pungencia, forma del fruto, tamaño y color (Wall *et al.*, 2002). Esta calidad se obtiene mediante el fitomejoramiento, a través de la introducción, cruzamiento y selección de material genético sobresaliente (Hernández, 2012); por lo tanto, está determinada por el genotipo de la variedad o el híbrido.

La sanidad es uno de los principales factores responsables de la expresión de la calidad (Bringel *et al.*, 2001). Se considera que una semilla posee calidad fitosanitaria si está libre de organismos que constituyan factores de riesgo a la producción, tales como hongos, bacterias, y virus (Hernández, 2012).

Las características de las semillas como el contenido de humedad, el peso por volumen y pureza de éstas, son considerados factores de calidad física. Adicionalmente, las características de color, tamaño, peso y daños visibles por hongos e insectos son cualidades importantes para

determinar este tipo de calidad (Hernández, 2012). Es importante tener en cuenta no sólo los daños visibles, sino también los efectos latentes causados especialmente por aplastamientos, que resultan ser más serios que las quebraduras, ya que favorecen la entrada de patógenos y por ende el deterioro también de la calidad fitosanitaria (Vieira *et al.*, 1994).

La calidad de la semilla, en términos de viabilidad y vigor, se conoce como fisiológica y se establece durante el periodo de desarrollo del cultivo.

La viabilidad se refiere al porcentaje de semillas en un lote que son capaces de germinar y formar una planta normal en condiciones óptimas, pero, no es suficiente para propósitos de agricultura que una semilla complete la germinación; además, debe poseer la habilidad para germinar bajo un amplio rango de condiciones muchas veces adversas en campo, a esto se le conoce como vigor (Bradford, 2004).

El vigor de la semilla depende de la constitución genética de la planta madre y del ambiente que la rodea. Semillas vigorosas producen plantas fuertes, uniformes y saludables que tienen un mejor desarrollo en su establecimiento y adicionalmente exhiben relativamente una mayor longevidad (Doijode, 2001).

### **3.7 Las Semillas de Chile**

La semilla en Chile representa la base para la obtención de las plántulas que se van a cultivar. Las semillas son diferentes en forma, tamaño, color; además que en germinación, comportamiento y latencia (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975). En Chile, las semillas tienen una forma aplastada hemidiscoidal. El lado más recto presenta el hilio, la superficie es relativamente lisa sin aspecto pubescente. La mayoría de las semillas se sitúan en la región de la placenta central y el peso y tamaño de la semilla están correlacionadas con el tamaño del fruto (Nuez, 2003).

Normalmente, una semilla contiene material de reserva (carbohidratos, lípidos, proteínas), frecuentemente presente en el endospermo que utiliza durante el proceso de germinación. En el caso del chile, el endospermo puede contener una variedad de material almacenado como almidón, aceite, proteínas o hemicelulosa, y es la principal colocación de los materiales de reserva (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Nuez, 2003). Las macromoléculas como proteínas y especialmente los carbohidratos fuente de energía metabólica usada para el reinicio de crecimiento del embrión en la germinación (Cochrane, 2000).

El embrión está curvado sobre sí mismo y consta de un eje embrionario con dos cotiledones y está constituido por la radícula dirigida hacia la región del hilio; el hipocotilo al que se unen los cotiledones curvados hacia el interior y la plúmula o epicótilo, donde se forman las primeras hojas no cotiledonares (Nuez, 2003).

Las semillas de chile presentan un comportamiento ortodoxo, manteniéndose viables por periodos de 5-8 años a contenidos de humedad entre 4 y 6 % y temperaturas de -10°C. Los cultivares de *C. annuum* no presentan fenómenos acusados de latencia en las semillas (Nuez, 2003). Aunque algunos cultivares cercanos a cultivares silvestres como el chile piquín si la presentan.

Sobre la germinación inciden diversos factores, destacando la necesidad de humedad y aireación, así como un rango térmico entre 20 y 30°C. Temperaturas próximas a 30 °C la germinación es más rápida que con temperaturas menores y a 35°C no se produce germinación (Nuez, 2003).

### **3.8 Desarrollo de las Semillas**

La formación, dispersión y germinación de semillas son estados cruciales en el ciclo de vida de las plantas. La tolerancia a la desecación, la movilidad de sustancias de reserva y habilidad

para programar la germinación para el momento con mejores condiciones ambientales son factores importantes en la sobrevivencia de muchas especies.

Los cultivos dependen de las semillas como propágulos para el establecimiento de nuevas plantas, por ejemplo en el cultivo de chile, requiere de estas como el principal método de reproducción (Bradford y Nonogaki, 2007).

Las semillas son estructuras complejas que consisten de tres componentes principales: el embrión que desarrolla en una plántula vegetativa; el endospermo que provee nutrimentos para el desarrollo del embrión durante los primeros estados de la plántula y la testa que cubre el resto de los componentes para protegerlos y controlar la germinación (Bewley y Black, 2000; Blasiak *et al.*, 2006)

La formación de estas estructuras y la adquisición de otras características se dividen en tres fases durante el desarrollo de la semilla: histodiferenciación, acumulación de reservas y adquisición de tolerancia a la desecación (Taiz y Zeiger, 2010). En cada uno de estos estados se incluye una serie de reacciones a nivel celular que determina el inicio y la conclusión de los procesos mediante la activación o silenciamiento de miles de genes (Bradford y Nonogaki, 2007).

La histodiferenciación ocurre inmediatamente después de la polinización, cuando el ovulo se activa para iniciar el desarrollo de las principales estructuras de las semillas; el embrión, el endospermo y las cubiertas seminales. El crecimiento inicial de la semilla se debe a la división y al alargamiento celular que se completan en los primeros días de su formación (Bradford, 2004). En las semillas de chile, el embrión proviene de un ovulo campilotropo por lo que está curvado sobre sí mismo. Consta del eje embrionario con dos cotiledones unidos al hipocotilo, la radícula dirigida hacia la región del hilo y la plúmula o epicotilo, de donde se forman las primeras hojas.

Seguido a este crecimiento, se presenta la acumulación de las reservas en órganos de almacenamiento; esto disminuye con el contenido de humedad debido a que los materiales de reserva sustituyen el agua de las células (Bradford, 2004). En chiles, el contenido de agua de las semillas declina en proporción con la acumulación de la materia seca, la cual resulta en un incremento de reservas pero ya sin presentarse incremento en el tamaño seminal (Blasiak *et al.*, 2006).

En la etapa de acumulación de reservas de la semilla se sintetizan en grandes cantidades de proteínas expresadas por diversos genes que se acumulan en organelos llamados cuerpos proteicos (Bewley y Black, 2000; Bradford, 2004).

En las semillas de chile es característico que el endospermo rodee al embrión y sea el principal material de reserva; Contiene una variedad de sustancias de reserva, de las que las proteínas y especialmente carbohidratos son catalizados para liberar energía metabólica que se utiliza para el reinicio del crecimiento del embrión durante la germinación (Nuez *et al.*, 2003).

La deposición de estos materiales durante el desarrollo de la semilla de chile son descritos por Blasiak *et al.* (2006) quienes observaron que a los 10 d después de anthesis (dda) se depositan proteínas en las membranas de unas pequeñas vesículas en el embrión; sin embargo, los cuerpos proteicos bien conformados se observan en células del embrión hasta los 30-35 dda sugiriendo que se formaron de la fusión de las proteínas contenidas en las vesículas de los estados tempranos de embriogénesis. Mientras que los gránulos de almidón estuvieron presentes en las células de los cotiledones a partir de los 25 dda pero no en estados tardíos. Los lípidos y las proteínas fueron las mayores reservas en los cotiledones a los 35 dda, así como en embriones maduros.

La deshidratación de la semilla contribuye a la dispersión de esta y permite su sobrevivencia durante largos periodos (Bradford, 2004). La tolerancia a la desecación está dada por la síntesis de proteínas y azúcares específicos que aunque se sintetizan durante la fase iniciales del

desarrollo, cuando el contenido de ácido abscísico es aún elevado, su acumulación se acelera durante la deshidratación, alcanzando el máximo en la madurez.

El disacárido trealosa es importante en la adquisición de tolerancia a la desecación porque cuando hay estrés hídrico, la estructura del disacárido le permite remplazar al agua en la membrana celular y así mantener su estructura. Este carbohidrato también mantiene la estructura de algunas proteínas durante la deshidratación y evita su desdoblamiento y desnaturalización. En algunas semillas la trealosa está ausente; en estos casos, la sacarosa en conjunto con algunos oligosacáridos puede realizar la función de ésta al crear un estado vidrioso en tejidos secos que disminuye la velocidad de las reacciones químicas que promueven la degradación de los componentes de la semilla (Buitink *et al.*, 2002).

En cuanto a las proteínas que se conocen como abundantes en embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés), estas se caracterizan por componerse de aminoácidos hidrofílicos que las hacen solubles en agua y resistentes a la desnaturalización causada por las altas temperaturas. Se han encontrado evidencias de la presencia de estas proteínas en otros órganos de la planta como respuesta a estrés ambiental y a la acumulación de ácido abscísico; esto sugiere que estas actúan en el mantenimiento de la conformación de la membrana celular durante la deshidratación. (Bewley y Black, 2000; Bradford, 2004).

### **3.8.1 Proteínas LEA**

En semillas de chile dulce se observó la ausencia de LEAs en los estados iniciales de madurez de la semilla (40 dda). Sin embargo, estas proteínas se expresaron con poca intensidad en semillas obtenidas de frutos cosechados 50 dda y almacenados 12 d. En semillas de 60 y 70 dda las proteínas se hicieron presentes en mayores cantidades indicando que su acumulación ocurre después del estado de maduración del fruto pues se asociaron a la etapa de madurez

fisiológica, donde la semilla inicia con la adquisición de tolerancia a la desecación (Vidigal *et al.*, 2009).

La presencia de proteínas LEA se correlaciona con la adquisición de tolerancia a la desecación. Las proteínas LEA, originalmente fueron descritas en las semillas de algodón; se acumulan en grandes cantidades en estructuras tolerantes a la desecación (semillas, polen) y en tejidos vegetativos sometidos a estrés de sequía, salinidad y frío. También se hallan en organismos anidrobióticos, en plantas de recuperación, algunos invertebrados y microorganismos. Desde un principio se les atribuyó un papel en las respuestas de las plantas en la adaptación al estrés (Shih *et al.* 2008).

Las proteínas LEA se clasifican en diversos grupos en función de dominios y secuencias de aminoácidos específicos, los grupos 1, 2 y 3 los que abarcan la mayoría de estas proteínas. Una característica general de estas proteínas es su elevada hidrofiliidad, alto contenido de aminoácidos y su falta de estructura en estado hidratado. A pesar de encontrarse mayoritariamente en forma de “random coil”, algunas adquieren un cierto grado de estructura durante la deshidratación o en la presencia de agentes promotores de  $\alpha$ -hélices (Shih *et al.* 2008). A nivel celular se han localizado en el citosol, núcleo, nucléolo, mitocondria, cloroplasto, vacuola, retículo endoplásmico, peroxisoma y membrana plasmática, donde se supone ejercen su función protectora frente al estrés. En relación a las modificaciones post-traduccionales, algunas se hallan fosforiladas. Los efectos protectores de las proteínas LEA se han demostrado mediante ensayos *in vitro* y en aproximaciones transgénicas que han dado lugar a fenotipos resistentes a la sequía, sal y frío. Por lo general, se considera que estas proteínas contribuyen a la protección y a la estabilización de macromoléculas y estructuras celulares en las respuestas de adaptación al estrés en plantas; sin embargo, sus funciones específicas aún no han sido esclarecidas (Shih *et al.* 2008).

Durante el desarrollo embrionario, y en la gran mayoría de los casos indicados para diferentes tipos de estrés medioambiental, la inducción de la expresión de los genes lea está mediada por el ABA. Esta fitohormona es capaz de inducir precozmente la expresión de dichos genes en embriones inmaduros o en tejidos vegetativos no estresados cuando se aplica exógenamente (Dure III, 1993). Las proteínas LEA son proteínas altamente hidrofílicas, ricas en glicina y en aminoácidos cargados que se caracterizan por no tener una estructura globular, y ser, por tanto, resistentes a la coagulación por efecto de las altas temperaturas (Dure III, 1993). Las proteínas LEA se agrupan en varias familias o grupos de acuerdo con la homología en la secuencia de aminoácidos, y fueron descritas primeramente por Dure en algodón (Ingram y Bartels, 1996; Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación. El agua, como resultado de su constante dieléctrica, mantiene in vivo la estructura de proteínas y fosfolípidos, y es posible que proteínas tales como las LEA D-11 y D-13, las cuales forman una estructura en “random coil” (aminoácidos orientados al azar), sustituyan el agua y mantengan la estructura de proteínas y membranas en ausencia de esta. Para proteínas tales como la D-29, que pueden formar hélices anfifílicas, se ha propuesto que puedan actuar como trampas de iones, secuestrando iones que están concentrados durante la desecación (Baker *et al.*, 1988).

En las semillas ortodoxas, la etapa final del proceso está marcado por la deshidratación, de tal manera que durante la fase de depósito de reserva, existe también la acumulación de moléculas potencialmente protectores, especialmente proteínas LEAs y azúcares solubles, tales como sacarosa, rafinosa y estaquiosa. Su función es evitar que el daño causado por la extracción de agua de los tejidos de semillas (Kermode, 1997; Hoekstra, 2001; Shih *et al.*, 2008 y Vidigal *et al.*, 2009). A pesar de que se sintetizan en las fases iniciales de desarrollo de la semilla, cuando el

contenido de ABA sigue siendo alta, su acumulación se acelera durante la deshidratación, alcanzando el máximo en la madurez (Bewley y Black, 1994; Vidigal *et al.*, 2009).

Estas proteínas poseen una elevada flexibilidad estructural la cual les permite adoptar estructuras diferentes y, por tanto, reconocer ligandos diversos conservando la especificidad en el reconocimiento de los mismos. En plantas, las hidrofilinas mejor caracterizadas son las proteínas LEA que se acumulan abundantemente en la semilla seca y en tejidos vegetativos cuando las plantas se exponen a condiciones de limitación de agua. Estas proteínas pueden tener una cierta función universal de osmoprotección, presenta características biofísicas que sugieren que puede llevar a cabo una función bipartita en estados déficit de agua. Durante la sequía, las proteínas LEA pueden establecer una cubierta de agua y disminuir la fuerza iónica. Después de la desecación, se puede mejorar la resistencia como biovidrio y actuar como un reemplazo del agua para estabilizar los componentes celulares (Shih *et al.*, 2008).

### **3.9 Madurez del Fruto y Extracción de Semilla de chile**

El fruto del chile es una baya con un pedúnculo grueso corto que varía en forma, color y acritud. El pericarpio es coriáceo o succulento y el color puede variar de verde a purpura o rojo. La baya se desarrolla en un ovario bicarpelar con placentación en la axila. Los componentes mayores de la fruta son semilla, pericarpio, placenta y pedúnculo. La placenta lleva numerosas semillas. El pericarpio se empieza a secar al madurar. Todos estos componentes pueden variar dependiendo de la variedad y las condiciones climáticas.

El fruto tarda unos 30-35 d en completar su desarrollo hasta la recolección en estado verde. Comienza a madurar entre 80 y 90 d después de anthesis. Todo el contenido de carotenoides como el de azúcares aumenta progresivamente con la madurez llegando en el primer caso hasta un 120 % en coloración con el estado verde del fruto (Salunkhe, 2003).

La cosecha del chile se lleva a cabo en dos fases: una para los frutos verdes y otra para los chiles secos. Los chiles verdes se recogen cuando están totalmente maduros pero antes de que cambien de color verde a rojo. El pimiento tarda unos 40 d en florecer después del trasplante y otros 30 d en desarrollar la fruta a un tamaño adecuado para la recolección. Se recogen a intervalos frecuentes, hasta una o dos veces por semana. La recolección frecuente de los frutos verdes estimula la floración y la producción de más frutos. La recolección de los chiles rojos se hace unos 80-90 d después del trasplante. La recolección de los frutos rojos se hace en 2 o 3 veces (Salunkhe, 2003).

Los frutos de chile se consideran en estado óptimo para el consumo cuando han alcanzado caracteres morfológicos característicos de la variedad (largo ancho y espesor del pericarpio), piel tersa y brillante y toleran la presión manual sin daños, sin embargo, el aspecto más visible del proceso de maduración del chile en la mayoría de las variedades es el cambio de color de verde a rojo o a otros colores como amarillo, chocolate-marrón o naranja (Nuez, 2003).

Existen otros índices como los usados en la industria de conservas por ejemplo: índice de color, relación de sólidos solubles en acidez que permite discriminar entre chiles maduros-rojos respecto a los maduros que acaban de virar de color, relación de azúcares con acidez, y el contenido de vitamina C.

El mayor número de frutos y de mayor tamaño se producen durante el primer ciclo de fructificación, aproximadamente entre los 90 y 100 días. Los ciclos posteriores tienden a producir progresivamente menos frutos o frutos de menor tamaño, como resultado del deterioro y agotamiento de la planta (Nuez, 2003).

Fenner (2000) menciona que en la mayoría de las especies de plantas, las semillas varían en su grado de germinación entre poblaciones y entre individuos. Algunas de estas variaciones pueden ser de origen genético, pero mucho de esto es debido a condiciones ambientales

La producción de semilla de chile en cualquier caso depende del cultivar, si es picante o dulce, ya que los tipos picantes son general mente de mayor producción de semilla (George, 1999).

En diferentes especies de plantas, los factores internos, tales como la posición de la inflorescencia en la planta madre o la posición de la semilla en el fruto pueden marcadamente influenciar el potencial de germinación de las semillas, así como la edad de la planta durante la inducción floral o durante la maduración de la semilla (Fenner, 2000). De acuerdo con esto, Doijode (1991) reporto que en semillas de chile, la viabilidad está influenciada por su posición dentro del fruto, ya que semillas de la porción basal del fruto tienen mayor potencial de viabilidad y de vigor que aquellas de la parte media del fruto.

La posición de la semilla en el fruto también puede afectar el color, la morfología y el vigor de la semilla en muchas especies de plantas. En algunas especies existen marcadas diferencias entre semillas provenientes de diferentes frutos de la misma planta (Fenner, 2000).

Las semillas que están completamente maduras tienen un mejor comportamiento durante el almacenamiento, la madurez de la semilla coincide con la madurez del fruto y es expresada por el cambio en el color del fruto. Frutos cosechados tempranamente dan semillas de baja calidad, con baja viabilidad y vigor, y los frutos cosechados en su color indicador de madurez proveen mayor viabilidad (Sayed and Essam, 1952).

Lo anterior hace referencia a que en las primeras etapas de la formación de semillas, estas aun no han alcanzado el desarrollo morfológico y fisiológico que les permita una germinación óptima. La pobre geminación de semillas inmaduras ha sido atribuida a bajos niveles de nutrientes, enzimas y hormonas indispensables para que dicho proceso se lleve a cabo correctamente (Kermode, 1995).

Semillas extraídas de frutos a los 48 d después de la anthesis tienen más alta viabilidad y vigor y semillas extraídas de frutos del segundo y tercer estrato tienen alta viabilidad después de 12 meses de almacenamiento, (Metha y Ramakrishna,1986).

Doijode (1988) reporta que las semillas de chile cosechadas en el estado de madurez muestran más alta germinación y un alto vigor en plántulas y pueden ser almacenadas por más tiempo bajo condiciones controladas.

Sánchez *et al.* (1993) notaron que las semillas de chile bell extraídas de frutos maduros en color verde no germinan y requieren de 14 d de almacenamiento para germinar, y que semillas extraídas de frutos rojos (50 d después de la anthesis) y de frutos sobre madurados (60 d después de la anthesis) presentaron mayor capacidad de germinación y un alto peso seco.

Navarro (1990) menciona que la calidad fisiológica de la semilla de tomate no se afecta por el grado de madurez; pero para propósitos de rendimiento y facilidad de extracción de la semilla se recomienda el grado de madurez maduro y pasado.

Hernández (1990) en un experimento en tomate encontró que los mejores resultados obtenidos para porcentaje de germinación, primer conteo de germinación, valor germinativo y peso volumétrico, fueron en semillas provenientes de un fruto en color rojo intenso y frutos en color naranja.

Robles (1992) reportó que los más altos porcentajes de germinación y viabilidad de la semilla de chile habanero se logran al cosechar los frutos en color naranja y pinto, y con un tiempo de postmaduración de 7 d después de la cosecha.

Montovani (1980) observó que un almacenamiento por tres días de los frutos de chiles en diferentes edades antes de la extracción, estimuló la germinación y aumentó el vigor de las semillas.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Localización del Sitio Experimental**

En Montecillo, Edo. México a los 19° 27' 32" LN, 98° 54' 22" LO y 2248 msnm se sembraron 100 semillas de dos tipos de chile Ancho (CP 1243) y Guajillo (CP 1150). Las poblaciones de chile se obtuvieron del banco de germoplasma del Colegio de Postgraduados, México.

### **4.2 Manejo del Experimento**

La siembra se realizó el 29 de Abril de 2012 en charolas de unicel de 200 cavidades con un sustrato estéril, dentro de un invernadero con cubierta de polietileno. El trasplante se hizo el 23 de junio de 2012 en bolsas de polietileno negras de 30 x 30 cm, utilizando tierra de monte, tierra negra con hojarasca y tezontle 1:1:1 como sustrato. Desde el trasplante al inicio de la floración se aplicaron tres riegos por semana y dos fertilizaciones con triple 18 aplicado al sustrato (2 g L<sup>1</sup>), además al inicio de la floración se adiciono nitrato de calcio (1 g L<sup>1</sup>).

### **4.3 Factores y Niveles de Estudio**

Al inicio de la floración (cuando 50 % de las plantas presentaba al menos dos flores, con las anteras expuestas) se etiquetaron diariamente por la mañana, las flores que estuvieran en antesis (con más del 50 % de anteras con presencia de polen). Posteriormente, se cosecharon 90 frutos de cada tipo de chile, en seis etapas de corte. A 30 de estos frutos se les extrajo la semilla inmediatamente después del corte, otros 30 frutos 7 d después del corte y al resto 14 d después del corte, los cuales se almacenaron en bolsas de papel en condiciones de 18 ± 2°C.

Conformándose así 36 tratamientos debido a tres factores y sus diferentes niveles de estudio, que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Factores y niveles de estudio en el experimento.

| <b>FACTOR</b>                      | <b>NIVELES</b> |
|------------------------------------|----------------|
| <b>Tipo de Chile</b>               | Guajillo       |
|                                    | Ancho          |
| <b>Fechas de Corte</b>             | 40 DDA         |
|                                    | 60 DDA         |
|                                    | 80 DDA         |
|                                    | 100 DDA        |
|                                    | 120 DDA        |
|                                    | 140 DDA        |
| <b>Época extracción de semilla</b> | 0 DDC          |
|                                    | 7 DDC          |
|                                    | 14 DDC         |

DDA: Días después de anthesis. DDC: Días después del corte

Después de extraer la semilla se realizó manualmente, se lavaron con agua corriente durante 1 min, posteriormente se remojaron en captan al 2 % durante 1 min, y se dejaron secar en toallas de papel durante 48 h a  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , finalmente se almacenaron en sobres de papel 15 d a  $18 \pm 1^\circ \text{C}$ .

## **4.4 Variables Respuesta**

### **4.4.1 Contenido de humedad de la semilla (H, %)**

Esta prueba se realizo en semilla fresca (inmediatamente después de la extracción) y seca (15 d después de las extracciones colocadas en laboratorio sin control de clima a  $18 \pm 1$  °C).

En la determinación del contenido de humedad, se utilizó el método de secado a la estufa a 130 °C, para esto se utilizaran 2 repeticiones de 50 semillas cada una. Para cada repetición se pesó una caja de aluminio y su tapa (P1) en una balanza analítica, después se depositó las semillas en la caja, se tapó inmediatamente y se pesó nuevamente (P2).

Se colocó la caja conteniendo las semillas en una estufa (Thelco 31480, EE. UU.) a la temperatura correspondiente durante 1 h. Al término del tiempo de exposición, se pesaron nuevamente obteniéndose el P3. El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente fórmula ISTA (2004).

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \times 100$$

La semilla secada durante 15 d fue la utilizada para determinación del resto de variables.

### **4.4.2 Peso de 1000 semillas (P1000S, g)**

Se contabilizaron ocho repeticiones de 100 semillas al azar, se pesaron en una balanza OHAUS, modelo Adventurer y se calculo el peso correspondiente a 1000 semillas mediante la siguiente fórmula ISTA (2004).

Se obtuvo la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación de la siguiente manera: Se peso cada repetición y se obtuvo el valor en gramos.

Se obtuvo la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación de la siguiente manera:

$$1. \text{ Varianza} = \frac{N(\sum X^2) - (\sum NX)^2}{N(N-1)}$$

Donde

X= Peso (g) de cada repetición

N= Numero de repeticiones

2. *Desviación típica (S) = Varianza*

3. *Coeficiente de variación =  $\frac{S}{\bar{X}}$  (100)*

Donde:

$\bar{X}$  = Media de peso de cien semillas

Si el coeficiente de variación no excede de 4, el resultado de la prueba será aceptado y calculado con la siguiente formula.

$$\text{Peso de 1000 semillas} = (\bar{X}) * 10$$

#### **4.2.3 Peso volumétrico (PV, kg hL<sup>-1</sup>)**

Se utilizó una probeta de 10 ml, en la que se depositó 1 ml de semilla seca en dos repeticiones y se peso en una balanza OHAUS, modelo Adventurer (ISTA 2004).

#### **4.2.4 Prueba de germinación (G, %) y velocidad de emergencia de radícula (VR)**

La prueba se condujo en un cuarto de germinación a 25 ± 1 °C, con luz constante; se emplearon cuatro repeticiones de 50 semillas tratadas con fungicida Captan 2 g L<sup>1</sup>, se utilizaron cajas cocteleras con toallitas húmedas (sanitas) y humedecidas con KNO<sub>3</sub> al 2 %. El porcentaje de germinación (G) se llevo al 100% en el total de semillas germinadas al final de la prueba.

Para la velocidad de germinación (VR), diariamente se contabilizaban las semillas germinadas (con protrusión de la radícula), hasta los 21 d lo que permitió observar la cinética de la germinación, la cual se calculo mediante la siguiente fórmula ISTA (2004).

$$VR = \sum_{i=1}^n \frac{X_i - X_{i-1}}{n}$$

Donde

$X_i$  = Número de semillas germinadas o emergidas en el  $i$  – ésimo conteo

$X_{i-1}$  = Número de semillas germinadas o emergidas en el conteo  $i-1$

$n$  = Número de días transcurridos desde la siembra hasta el  $i$ - ésimo conteo

#### **4.2.5 Germinación posterior al envejecimiento acelerado (G-EA, %)**

Se realizó una prueba de envejecimiento acelerado (EA), en la cual 100 semillas se distribuyeron uniformemente sobre un tamiz de malla de alambre suspendida sobre 100 ml de agua destilada, dentro de una caja de plástico tipo “sandwichera” de 11 cm x 11 cm x 3.5 cm, (AOSA, 1983). Las semillas se sometieron a  $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 100 % de humedad relativa durante 72 h. Posteriormente las semillas, se pusieron a germinar en una prueba de germinación estándar como se describió anteriormente.

#### **4.2.6 Conductividad eléctrica (CE, $\mu\text{S cm}^1 \text{g}^{-1}$ )**

Se determino en cuatro repeticiones de 50 semillas tomadas al azar, que se pesaron y se sumergieron en 50 mL de agua desionizada durante 24 h a  $25^\circ\text{C}$  (ISTA, 2004). La conductividad eléctrica de la solución de inhibición se midió utilizando un medidor de conductividad, Modelo 72729 (Oakton, Singapur).

#### **4.2.7 Diseño experimental y análisis estadístico**

En las variables de contenido de humedad y peso volumétrico se obtuvieron promedios por tratamientos y desviaciones estándar mediante la hoja electrónica Excel<sup>®</sup> 2007 (Microsoft, Inc. EE.UU). Los promedios de datos observados se ajustaron a curvas poligonales. Para las demás variables se realizó un Análisis de Varianza. Los datos de las variables medidas en porcentaje, previo al análisis, se transformaron con la función arco seno  $\sqrt{X/100}$ . Las variables se analizaron con base en un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 2x6x3, correspondiente a los dos tipos de chile, las seis etapas de corte en el desarrollo del fruto y las tres épocas de extracción de semillas. Estos análisis se hicieron con el Statistical Analysis System versión 9.1.3 (SAS, 2003).

#### **4.2.8 Actividad de proteínas LEA**

La extracción y determinación de la actividad de proteínas LEA se llevó a cabo en embriones frescos (obtenidos de semilla recién cosechada) excepto en las semillas cosechadas a los 40 DDA, pues aún no tenían embrión bien formado. La extracción del embrión se realizó manualmente en semillas que se mantenían en agua destilada para evitar la deshidratación. A las semillas se les realizaba un corte en la calaza y de allí se extrajo el embrión. Se extrajeron aproximadamente 200 mg de embriones en el menor tiempo posible, que se mantenían en agua destilada y al final se sumergieron en nitrógeno líquido, para su posterior almacenamiento a  $-80 \pm 2$  °C.

Aproximadamente 50 mg de embriones congelados se molieron en 1 ml de solución Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5), utilizando un mortero y pistilo refrigerados. El triturado fue trasladado a microtubos de 1500  $\mu$ L y se centrifugó (16000 G) durante 30 min a 4 ° C. El sobrenadante se calentó durante 15 min a 85 °C en baño María y se centrifugó como antes (16000 G), durante 30

min a 4 ° C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo y el precipitado se desechó. Para la electroforesis, se cuantificó la cantidad de proteínas existente en el sobrenadante por el método de Bradford, buscando ajustar la cantidad de sobrenadante necesaria para tener 40 µg de proteína soluble en cada muestra; esta cantidad se adiciono con 10 µL de solución buffer de carga magic mix (SDS(10 %):2.0 ml (10% (p/v)); B-ME: 500µl; Gliceról: 1.0 ml; Azul de Bromofenol: 0.05% (p/v); Tris HCl (0.5M, pH 6.8) 1.25 ml y esto se afora a 10 ml con Agua destilada). La mezcla se colocó en un baño maría hirviendo durante 5 min y se aplicó a cada recipiente (Pozo) de la cámara de electroforesis conteniendo gel de SDS-PAGE (poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) (12%, gel de separación, 6% de concentración de gel). La electroforesis se realizó a 120 V y el gel se tiñó por 12 h en una solución que contiene 0,05% de azul de Coomassie y se destiñó en ácido acético 10% (modificado de Alfenas, 2006).

Se colocó un marcador (Sigma) de proteínas cuyo peso molecular es conocido. El análisis e interpretación de los geles resultantes se hizo observando la presencia-ausencia de bandas y comparando su peso molecular con el marcador conocido; así, el peso molecular de las proteínas propuestas para ser LEAs en el embrión de chile se comparó con la literatura existente adema con los resultados de las otras variables como la germinación y el vigor.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La floración o antesis en Chile Guajillo ocurrió a los 40 d después del trasplante (ddt) y en Chile Ancho a los 45 ddt.

Los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que acompañan la maduración de la semilla de estos chiles, son de particular interés, puesto que conducen a la identificación de factores involucrados en la obtención de semilla de máxima calidad, es por ello que se midieron detalladamente esos cambios, obteniendo lo que a continuación se reporta.

### 5.1 Contenido de Humedad

#### 5.1.1 Contenido de humedad en semillas recién extraídas

Semillas extraídas (semilla fresca), a los 40 DDA eran inmaduras, mucilaginosas, delgadas y con contenido de humedad (H) mayor al 75 % en ambos tipos de Chile (Figura 3). De manera general, para semillas de Chile Ancho, entre los 40 y los 80 DDA ocurrió una reducción rápida de la humedad cerca de  $47 \pm 4$  %, valor en el que se mantuvo hasta los 140 DDA e inclusive en semillas almacenadas en el fruto durante 7 y 14 DDC (Figura 3A). Lo anterior indica que mientras se mantienen en el fruto, las semillas alcanzan un punto de equilibrio alrededor de 47 % en su contenido de Humedad. Pérez-Camacho *et al.* (2008) observaron este mismo punto de equilibrio en semillas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot.) el cual alcanzó 45 % de contenido de humedad. Al respecto, Modi y White (2004) reportaron en jitomate tipo cherry que durante la madurez de la semilla la pérdida de humedad se debe a que ocurre un flujo de salida de agua hacia la placenta, flujo que probablemente este asociado con uno de entrada de azúcares solubles, que permite la deposición y acumulación de reservas (Bewley *et al.*, 2013). Las semillas que se desarrollan en los frutos carnosos, como el tomate (Demir y Ellis, 1992 a; Dias *et al.*, 2006), pimiento (Demir y Ellis, 1992 b, Vidigal *et al.* 2009), melón (Welbaum y Bradford, 1988)

y la berenjena (Demir *et al.*, 2002) por lo general oscila entre 38 y 45 %, y permanece alta durante todo el período de maduración, incluso después de la acumulación de la materia seca máxima.

Lo anterior contrasta con el comportamiento de H en las semillas de chile Guajillo (Figura 3B), donde la H disminuye de manera general durante todo el periodo del desarrollo de la semilla, llegando a niveles de  $17 \pm 3$  % en el muestreo de 140 DDA. Aunque la disminución de H podría considerarse aun menos drástica en algunos muestreos en frutos almacenados 7 y 14 DDC (a los 60 DDA, por ejemplo), de manera general H tiene un mismo comportamiento entre los tres tiempos de almacenamiento postcosecha del fruto.

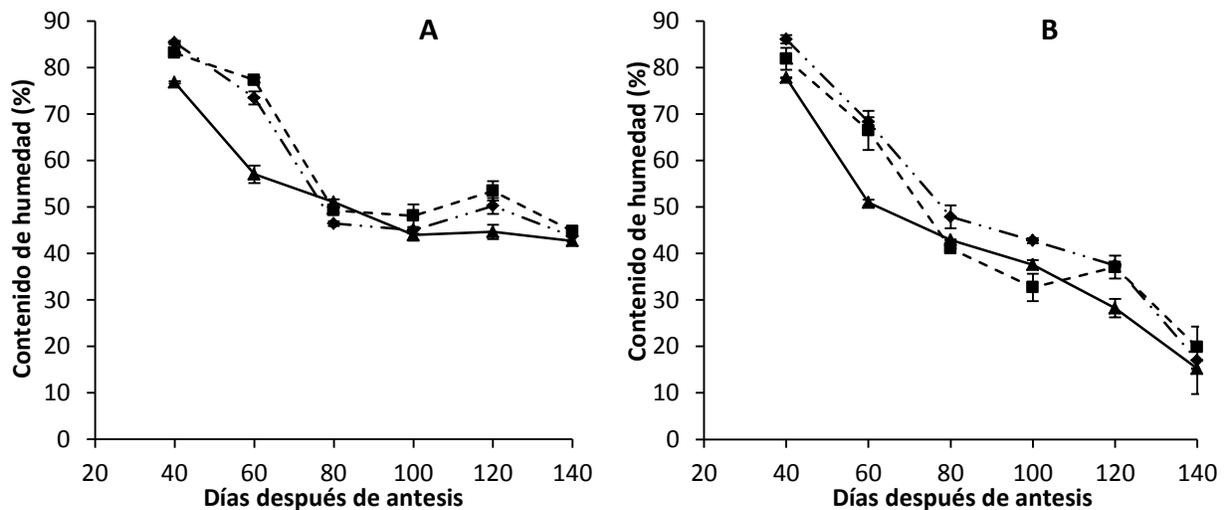


Figura 3. Contenido de humedad de semilla recién extraída en frutos de dos tipos de chile (A: Ancho y B: Guajillo) cosechadas en seis etapas de desarrollo y tres períodos de postcosecha del fruto: -▲- 0 días después del corte (DDC), -■- 7 DDC y -▲- 14 DDC. Las barras horizontales representan la desviación estándar.

La diferencia en el comportamiento de esta variable es probablemente debida a que el fruto de chile Guajillo el grosor del pericarpio es menor que el del chile Ancho, sobre todo al final de su ciclo de desarrollo. De hecho este tipo chile Guajillo se comercializa seco y los productores de algunas zonas de México, de forma empírica, esperan que el fruto este seco para extraer la semilla.

### **5.1.2 Contenido de humedad en semillas secadas por 15 d en condiciones de laboratorio.**

En general, las semillas puestas a secarse durante 15 d en condiciones de laboratorio  $18 \pm 1$  °C, de ambos tipos de chile, presentaron un contenido de humedad promedio de  $6.4 \pm 0.6$  % H, excepto las semillas que fueron cosechadas 40 DDA, que presentaron  $9.5 \pm 1$  % H (Figuras 4A y 4B), lo cual es normal pues a los 40 DDA las semillas contienen valores muy altos de H como ya se ha indicado. El contenido de humedad de la semilla se modifica conforme esta se pone en equilibrio dinámico con el aire que la rodea (Pittcock, 2008; Rodríguez *et al.*, 2011). Los porcentajes encontrados están dentro del rango para considerar a una semilla viva (Copeland y McDonald, 2001; Ayala *et al.*, 2014), de igual forma se consideró que no afectan el comportamiento del resto de variables físicas y fisiológicas de las semillas.

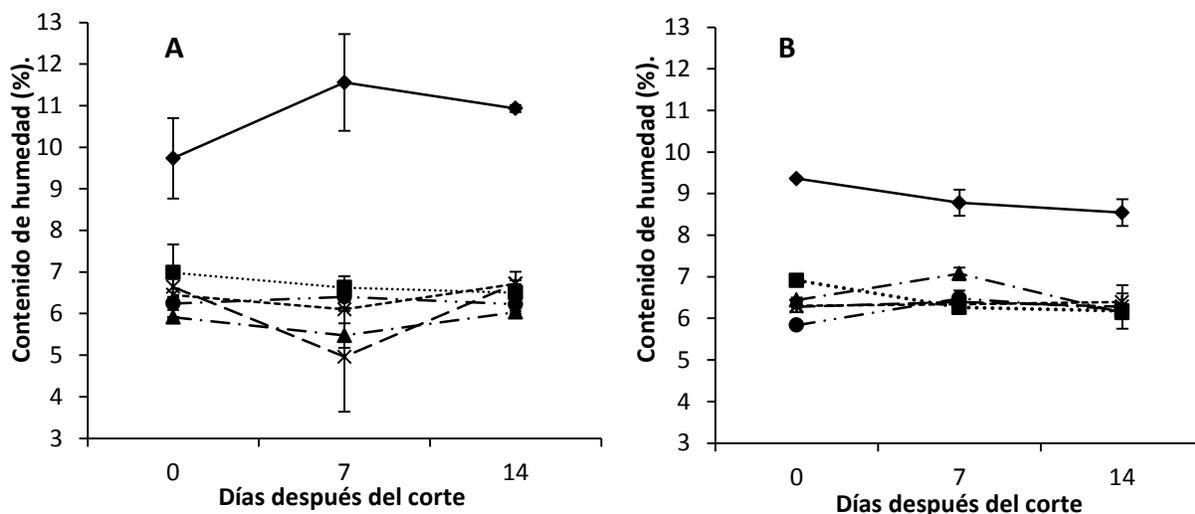


Figura 4. Contenido de humedad de semilla seca durante 15 d en condiciones de temperatura ambiente ( $18 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de dos tipos de chile (A: Ancho y B: Guajillo) cosechadas en seis fases de desarrollo: ◆ 40 días después de antesis (DDA), ■ 60 DDA, ▲ 80 DDA, ✕ 100 DDA, ✱ 120 DDA, ◐ 140 DDA y tres periodos de conservación postcosecha del fruto: 0, 7 y 14 días después del corte. Las barras horizontales representan la desviación estándar.

## 5.2 Peso de 1000 Semillas y Peso Volumétrico

El peso de 1000 semillas (P1000S) es una variable que puede señalar las principales fases que la semilla atraviesa durante su desarrollo. En el Cuadro 2 se muestra el resultado del análisis de varianza de esta variable. Todas las fuentes de vario presentaron un efecto significativo sobre la variable.

Cuadro 2. Grados de libertad, cuadrados medios y significancia estadística en los análisis de la varianza de la variable de calidad física peso de 1000 semillas.

| Fuente de Variación | Grados de Libertad | Peso de 1000 semillas (g) |
|---------------------|--------------------|---------------------------|
| Tipo (C)            | 1                  | 2.9123 **                 |
| Fecha (F)           | 5                  | 4.0275 **                 |
| C*F                 | 5                  | 0.0290 **                 |
| Extracción (E)      | 2                  | 0.1680 **                 |
| C*E                 | 2                  | 0.0193 **                 |
| F*E                 | 10                 | 0.0436 **                 |
| C*F*E               | 10                 | 0.0170 **                 |
| C.V. (%)            |                    | 4.1                       |
| R <sup>2</sup>      |                    | 0.98                      |

C.V.= Coeficiente de variación; \*\* = Altamente significativo con un  $\alpha \leq 0.05$ .

Si se observa la cinética que sigue esta variable en semillas extraídas del fruto sin almacenamiento postcosecha (0 DDC) en ambos tipos de chile (Figura 5), se pueden distinguir dos principales fases: la primera de un rápido crecimiento, que se detiene a los 80 DDA y la segunda de un crecimiento más lento que en el caso del chile Ancho parece continuar hasta los 140 DDA (Figura 5A), es decir hasta el último muestreo; y en el caso del chile Guajillo el peso

máximo se alcanza a los 100 DDA, quedando estable hasta el final. Resultados similares fueron obtenidos por Ayala *et al.* (2014). Copeland y McDonald (2001) consideran que la máxima acumulación de materia seca, se logra cuando la semilla llega a su madurez fisiológica.

En cuanto al efecto del almacenamiento postcosecha del fruto, en los tres muestreos iniciales (40, 60 y 80 DDA), el P1000S de frutos sin almacenamiento postcosecha (0 DDC) en ambos tipos de chile, fue inferior al P1000S de los frutos almacenados durante 7 DDC y 14 DDC (Figura 5A y 5B). Lo anterior se puede interpretar como que la semilla al interior del fruto sigue recibiendo fotosintatos que provienen de los tejidos del fruto, lo que le permite completar la fase de acumulación de reservas. De hecho en el muestreo realizado a los 80 DDA en ambos tipos de chile cuando la semilla queda 7 y 14 DDC dentro del fruto, alcanza su máximo P1000S similar al que alcanza a los 140 DDA.

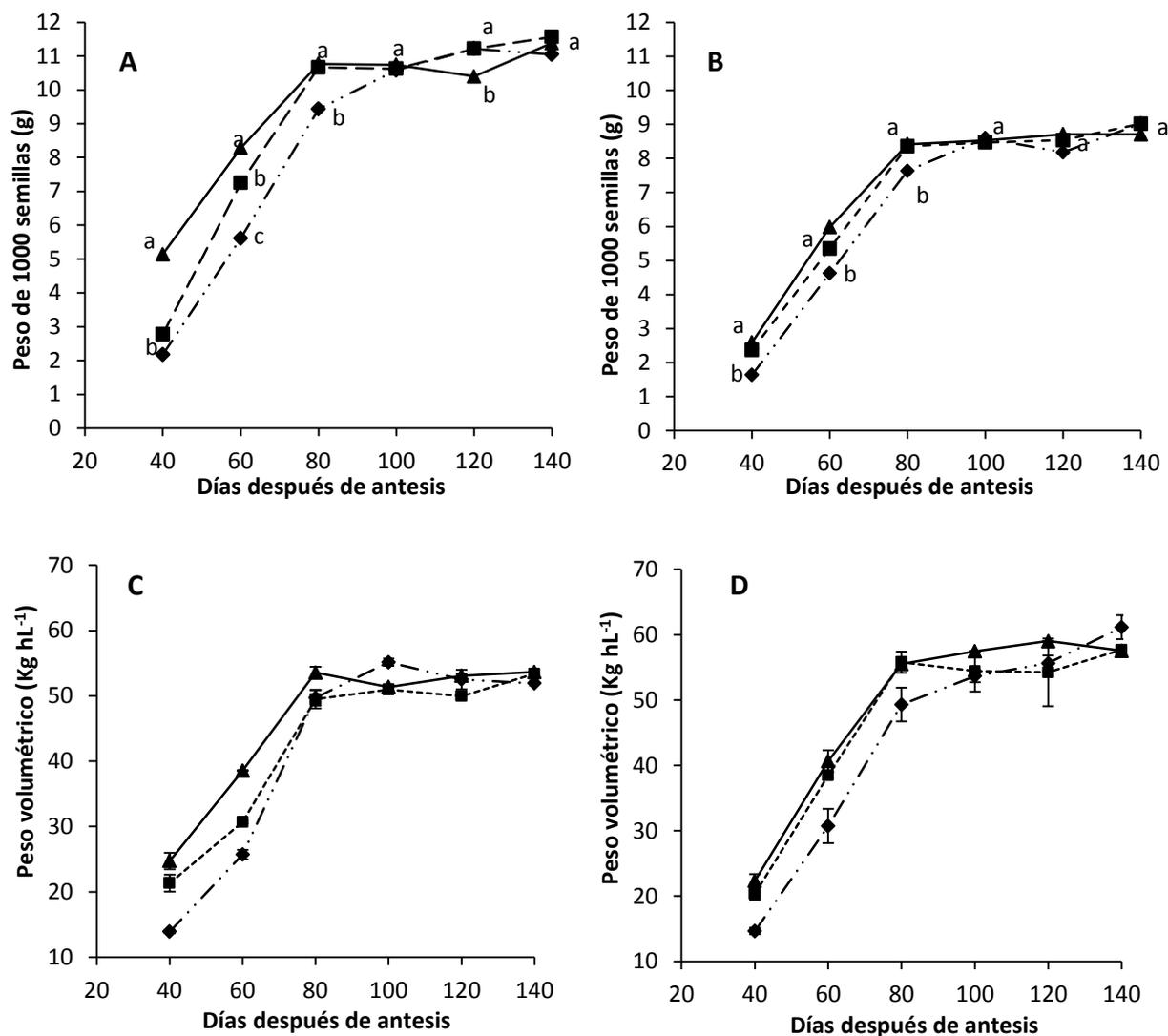


Figura 5. Evolución del peso de mil semillas y volumétrico en chile Ancho (A y C, respectivamente) y Guajillo (B y D, respectivamente) cosechadas en seis etapas de desarrollo y tres períodos de postcosecha del fruto: -◆- 0 días después del corte (DDC), -■- 7 DDC y -▲- 14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las barras horizontales representan la desviación estándar.

La variable peso volumétrico (PV) alcanza el máximo a los 80 DDC para todos los tratamientos a excepción de la semilla proveniente de frutos sin almacenamiento postcosecha (0

DDC) de ambos tipos de chile. En el caso del chile Ancho, PV crece hasta los 100 DDA y en chile Guajillo su crecimiento continua hasta el último muestro a los 140 DDA. A pesar de lo anterior, a partir de los 80 DDA las semillas de ambos tipos de chiles se encuentran en un rango que varía entre 48 y 58 kg hL<sup>-1</sup> y en el caso particular de la semilla de chile Ancho su promedio fue de 52.1 ± 2 kg hL<sup>-1</sup>. En el caso de la semilla de chile Guajillo el promedio de PV se situó en 56 ± 2 kg hL<sup>-1</sup>.

Bradford (2004) señala que la importancia de evaluar el peso hectolitrico, radica en que este es un indicador de la calidad física y que un cultivo con deficiencia de nutrimentos, agua, daño por heladas o granizo, plagas y enfermedades producirá semilla de menor peso. Conforme la semilla se acerca a su madurez, existe una acumulación de reservas que les da un mayor peso y masa mientras las condiciones de crecimiento son favorables. El crecimiento de la semilla es constante y su estancamiento depende de los factores que determinaran la senescencia del fruto (Rodríguez *et al.*, 2011).

### **5.3 Germinación**

La fuente de variación (FV) (Cuadro 3) de la interacción tipo de chile con fecha de extracción (C\*E) resulto no significativa para las variables: G, VR y G-EA, esto indica que el efecto combinado entre los tipos de chile y de la fecha de extracción no indujo cambios en ninguna de estas variables, además FV tipos de chile (C) sobre CE y la interaccion tripe de C\*F\*E sobre la variable germinación posterior al envejecimiento acelerado (G-EA), Resultaron no significativas.

Cuadro 3. Grados de libertad, cuadrados medios y significancia estadística en los análisis de la varianza de las variables de calidad fisiológica de semillas.

| FV             | GL | G<br>(%)    | VR<br>(radículas d <sup>-1</sup> ) | G-EA<br>(%) | CE<br>(μS cm <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) |
|----------------|----|-------------|------------------------------------|-------------|--|
| Tipo (C)       | 1  | 682.07 **   | 11.02 **                           | 453.49 *    | 2928.07 NS                                   |
| Fecha (F)      | 5  | 34425.38 ** | 51.24 **                           | 33854.95 ** | 5423701.97 **                                |
| C*F            | 5  | 178.47 **   | 0.74 **                            | 183.67 **   | 118530.53 **                                 |
| Extracción (E) | 2  | 3745.85 **  | 19.42 **                           | 1597.86 **  | 21976.49 **                                  |
| C*E            | 2  | 4.97 NS     | 0.29 NS                            | 2.21 NS     | 51266.88 **                                  |
| F*E            | 10 | 1895.32 **  | 11.05 **                           | 1781.14 **  | 828936.23 **                                 |
| C*F*E          | 10 | 116.18 **   | 0.47 *                             | 34.56 NS    | 40562.44 **                                  |
| C.V. (%)       |    | 10.0        | 9.27                               | 11.71       | 8.31   |
| R <sup>2</sup> |    | 0.98        | 0.98                               | 0.98        | 0.99   |

FV= Fuente de variación; GL=Grados de libertad; C.V.= Coeficiente de variación; G= Porcentaje de germinación; G-EA= Germinación posterior a envejecimiento acelerado; VR = Velocidad de emergencia de radícula; CE=Conductividad eléctrica. \*\* = Altamente significativo y \* = Significativo con un  $\alpha \leq 0.05$ ; NS = No significativo;.

La cinética de la germinación a lo largo del desarrollo de la semilla en ambos tipos de chile sigue para las seis etapas de desarrollo una función sigmoideal caracterizada por una fase donde el crecimiento de la curva no existe, seguido de un crecimiento exponencial que concluye con una fase de crecimiento mas lento o completa detención del crecimiento (Figura 6).

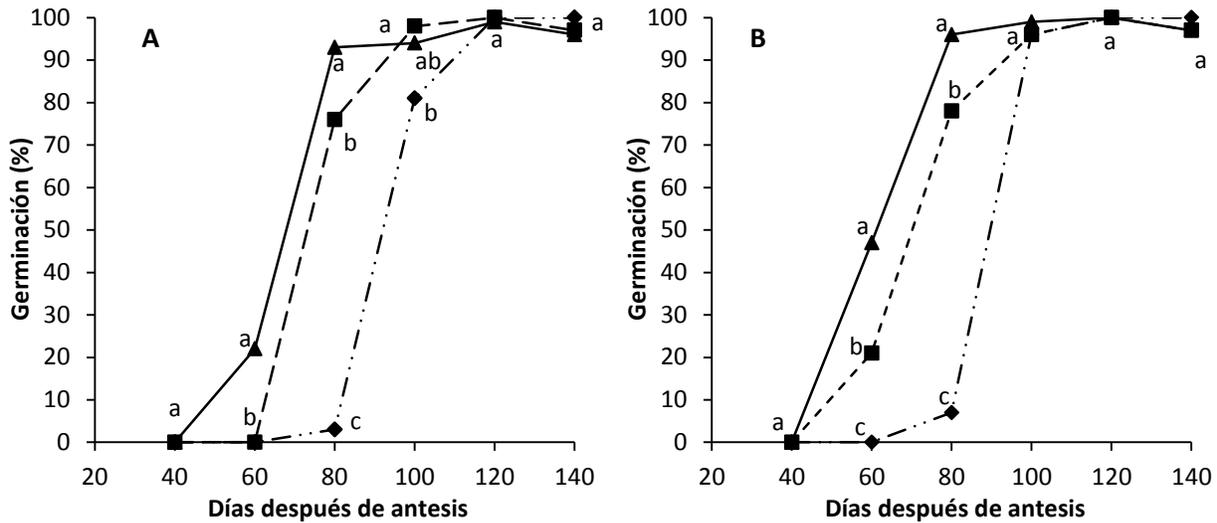


Figura 6. Evolución de la germinación de la semilla en Chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y tres periodos de almacenamiento postcosecha del fruto: —◆— 0 días después del corte (DDC), ---■--- 7 DDC y —▲— 14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

De esta forma, las semillas en las diferentes etapas de desarrollo no presentaron germinación a los 40 DDA. Si inicialmente consideramos solo el desarrollo de la semilla extraída sin almacenamiento postcosecha del fruto (0 DDC), se puede observar que la semilla del Chile Guajillo (Figura 6B) alcanza más rápidamente valores cercanos al 100% (100 DDA) mientras que la semilla de Chile Ancho lo alcanza hasta los 120 DDA.

La germinación de las semillas se incrementa con el almacenamiento postcosecha en ambos tipos de Chile. A los 7 DDC, tanto en Chile Ancho como en Guajillo aumentó un promedio de 14% G. Cuando el almacenamiento postcosecha es de 14 DDC el aumento de la germinación en Chile Ancho es de 20% y para Chile Guajillo de 22%, respecto a su similar sin almacenamiento postcosecha (0 DDC), (Figura 7).

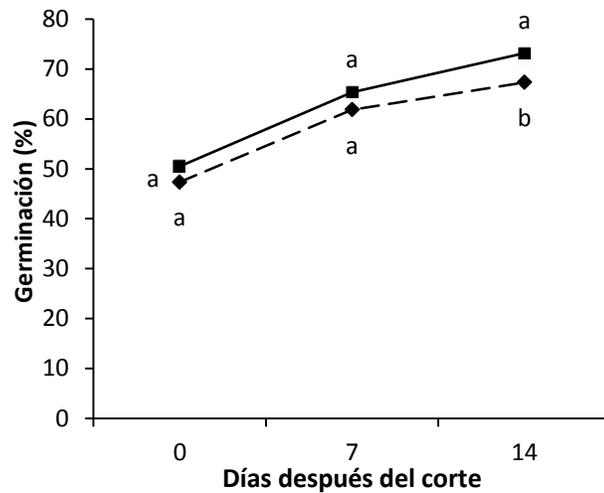


Figura 7.1 Comparación de la germinación de semillas de chile Ancho  $\text{---}\blacklozenge\text{---}$  y Guajillo  $\text{---}\blacksquare\text{---}$  provenientes de frutos almacenados durante: 0, 7 y 14 días después del corte (DDC). Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

En frutos cosechados a los 60 DDA, la germinación de semilla se ve favorecida principalmente en Chile Guajillo ya que cuando se almacena la semilla 7 y 14 DDC la germinación llega a 21 y 47 % respectivamente. A los 80 DDA, los frutos almacenados postcosecha 7 DDC presentan un aumento significativo en la germinación de la semilla logrando que más del 75 % de la semilla de ambos tipos de Chile germinen. El almacenamiento del fruto durante 14 DDC mejora significativamente la germinación respecto al almacenamiento de 7 DDC y permite que la semilla de ambos tipos de Chile sea mayor a 92 % de germinación llegando a 96 % de germinación en Chile Guajillo (Figura 6).

En la semilla de Chile Guajillo a partir de los 100 DDA un almacenamiento postcosecha del fruto no tiene ningún beneficio en la germinación de la semilla que contiene. La misma situación se presenta para la semilla del Chile Ancho, pero a partir de 120 DDA.

La mejor germinación se presentó en la etapa de desarrollo de 120 DDA con las tres épocas de extracción con un 100 % de germinación en ambos tipos de chile. Un descenso del porcentaje de germinación posterior a esta etapa del desarrollo podría explicarse por una exposición durante mas tiempo a factores ambientales que provocan el inicio del deterioro de las semillas como le sucedió a Ayala *et al.* (2014), en chile Ancho y Guajillo, al presentarse temperaturas congelantes al final del ciclo de producción de semilla. De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2011) y Pichardo *et al.* (2014) los atributos de calidad (germinación, peso, vigor, etc.) se incrementan conforme la semilla se desarrolla, llegando a su máxima expresión en la fase de madurez fisiológica; a partir de ese momento, existe un proceso irreversible de pérdida de dichos atributos en un fenómeno complejo denominado deterioro de la semilla, el cual culmina con la muerte de la misma.

## **5.4 Vigor**

El vigor se considera como el último parámetro de la calidad fisiológica que la semilla adquiere durante su formación (Bewley *et al.*, 2013) y el que más fácilmente pierde durante el deterioro.

La velocidad de emergencia de la radícula (VE) y la germinación posterior a EA son dos de las variables que tradicionalmente se utilizan para evaluar el vigor (Vidigal *et al.*, 2009; Ayala *et al.*, 2014).

### **5.4.1 Velocidad de emergencia de radícula**

De igual forma que la germinación, la velocidad de emergencia de radícula (VE) (Figura 8) sigue una cinética de crecimiento sigmoide en cualquiera de sus tratamientos (tipos de chile y almacenamiento postcosecha de fruto).

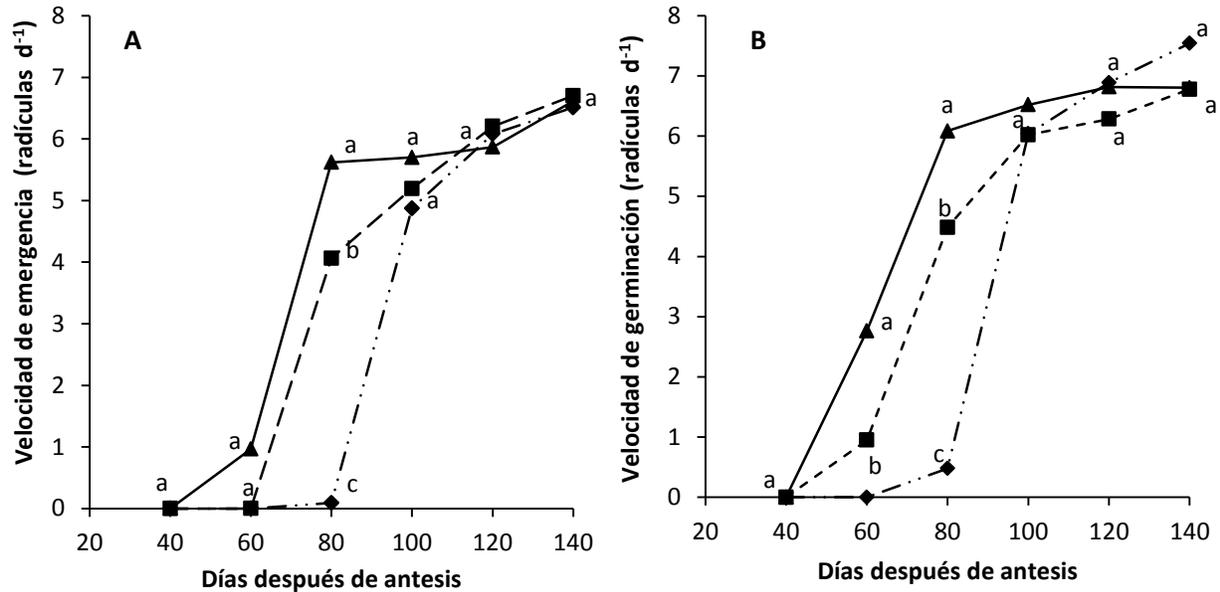


Figura 8. Evolución de la velocidad de emergencia de radícula en Chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y tres periodos de almacenamiento postcosecha del fruto:  $\text{---}\blacktriangle\text{---}$  0 días después del corte (DDC),  $\text{---}\blacksquare\text{---}$  7 DDC y  $\text{---}\blacklozenge\text{---}$  14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

En frutos sin almacenamiento postcosecha (0 DDC) la variable VE aumentó significativamente en semillas con 100 DDA de desarrollo tanto en Chile Ancho como en Chile Guajillo. En frutos de Chile Guajillo de 60 DDA de desarrollo almacenados 7 y 14 DDC existe un aumento significativo en el valor VE llegando a 0.9 y 2.8 (radículas d<sup>-1</sup>) respectivamente. Sin embargo, estos valores se consideran muy bajos para poder recomendar estos tratamientos. En estudios posteriores se sigue estudiando periodos de mayor tiempo de almacenamiento postcosecha.

El muestreo a los 80 DDA es el que se ve beneficiado más fuertemente con el almacenamiento postcosecha de los frutos de ambos tipos de Chile. A los 14 DDC el valor de VE

se establece en 5.6 radículas d<sup>-1</sup> para Chile Ancho y 6.1 radículas d<sup>-1</sup> para Guajillo. En el caso de Chile Ancho este valor representa el 85 % de valor que alcanzan al final a los 140 DDA y en el caso de Chile Guajillo es similar estadísticamente al máximo valor de VE alcanzado.

### 5.4.2 Germinación posterior a envejecimiento acelerado

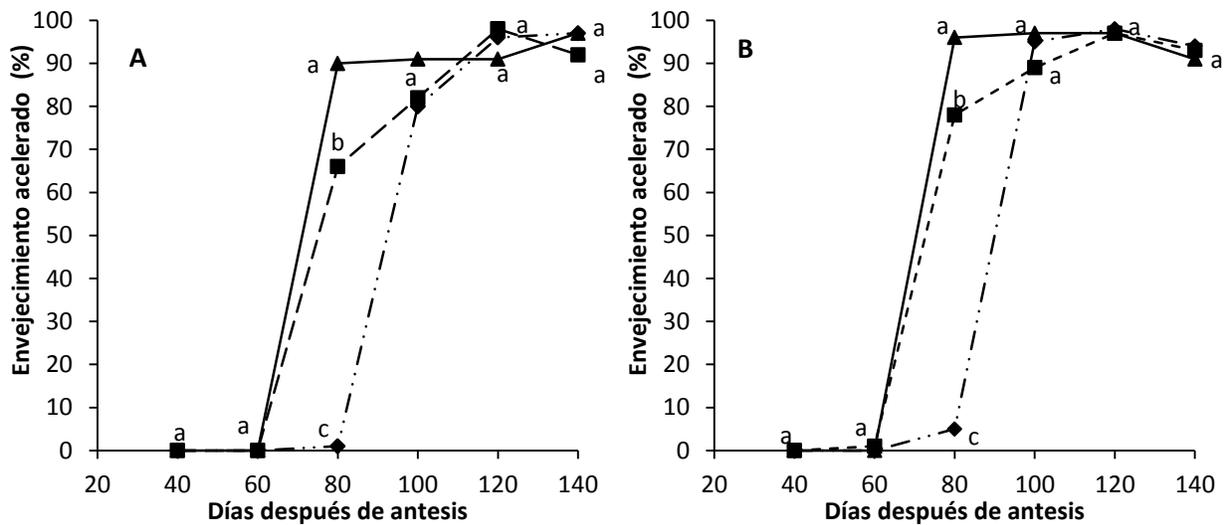


Figura 9. Evolución de la germinación posterior al envejecimiento acelerado en Chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y tres periodos de almacenamiento postcosecha del fruto: —●— 0 días después del corte (DDC), - -■- - 7 DDC y —▲— 14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

La germinación de la semilla después de la prueba de envejecimiento acelerado, sigue un comportamiento similar en los dos tipos de Chile y los tratamientos postcosecha. A partir de los 80 DDA el almacenamiento postcosecha de 7 y 14 DDA mejora el vigor de la semilla respecto a la semilla extraída de frutos sin almacenamiento postcosecha (0 DDC). En el caso de los frutos cosechados a los 80 DDA y almacenados 14 DDC, el porcentaje de germinación alcanza valores

estadísticamente similares a los valores máximos en ambos tipos de chile (90 % en Ancho y 96% en Guajillo), lo que demuestra que en esta fecha de muestro el almacenar los frutos 14 DDC confiere vigor a la semilla (Figura 9).

### **5.5 Conductividad eléctrica**

Tradicionalmente esta prueba se utiliza como indicador de la viabilidad de la semillas (ISTA, 2004). Al medir conductividad eléctrica (CE) de la solución de imbibición se miden los solutos liberados por las semillas, lo cual es inversamente proporcional a la viabilidad de estas; ya que se considera que una mayor CE indica la organización o integridad de las membranas es deficiente. En este trabajo de investigación la disminución de la CE (Figura 10) indicaría mejoras en la organización de la membrana durante el proceso de maduración. Demir y Ellis (1992a) encontraron que la conductividad eléctrica de las semillas de jitomate fue mayor 25 DDA que a 55 DDA, lo cual coincidió con la germinación máxima de las semillas.

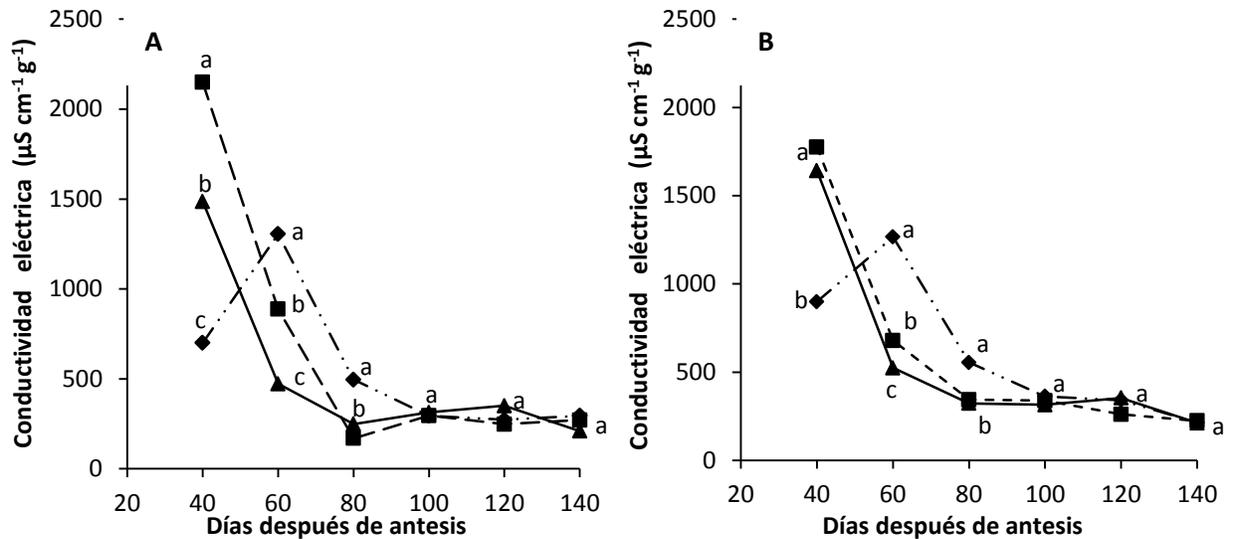


Figura 10. Cinética de la conductividad eléctrica de semillas de chile Ancho (A) y Guajillo (B), cosechadas en seis etapas de desarrollo. Y en tres épocas de conservación postcosecha de fruto —♦— 0 días después del corte (DDC), —■— 7 DDC y —▲— 14 DDC. Misma letra en el mismo muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

La magnitud de los valores registrados de CE en este trabajo es similar a lo observado por Vidigal *et al.* (2009) en semillas de *Capsicum annuum* L. del tipo “sweet pepper” en proceso de maduración y durante diferentes periodos de almacenamiento postcosecha de frutos.

Al considerar la semilla proveniente de frutos sin almacenamiento postcosecha (0 DDC), se puede observar en ambos chiles un aumento del valor de CE cuando se pasa de 40 a 60 DDA y a partir de este muestreo la curva disminuye hasta los 100 DDA llegando a valores de 295 y 363.3  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  para Ancho y Guajillo respectivamente. Aunque la tendencia general en ambos tipos es mantener valores altos al inicio y mas bajos al final del desarrollo, el incremento que se observa entre 40 y 60 DDA no parece lógico. Una posible explicación parece posible.

A los 40 DDA, la semilla es casi un primordio, y los fotosintatos que le llegaron hasta ese momento del desarrollo son aún muy pocos, por lo que , al ponerse a imbibir la cantidad de solutos liberados es más baja que en semilla un poco más desarrollada. Si se comparan con los valores de semillas provenientes de frutos con 7 y 14 d de almacenamiento postcosecha, se puede ver que los valores son estadísticamente superiores en estos tratamientos. Esto sería debido entonces a un mayor crecimiento o acumulación de fotosintatos lo que se puede verificar al comparar los valores del peso semillas (P1000S) en la Figura 5A y 5B. En ambos chiles, tanto las semillas provenientes de frutos almacenados 7 DDA como en 14 DDA tienen un peso estadísticamente superior y en el caso de Guajillo, por ejemplo, estas pesan igual entre ellas pero más que la semilla proveniente de frutos sin almacenamiento (0 DDC) comportamiento similar a la CE de estas semillas (Figura 10).

En el resto de tratamientos, la CE de la semilla de frutos almacenados 7 y 14 DDC de ambos tipos de chile, llega al mínimo a los 80 DDA donde parece estabilizarse.

### **5.6 Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant)**

En la fase final del desarrollo de la semilla ocurre la deshidratación de la misma. Este fenómeno contribuye a dispersión y permite la sobrevivencia durante largos periodos (Bewley *et al.*, 2013). El proceso de deshidratación es conocido como adquisición de la tolerancia a la desecación y ha sido estudiado en semillas de diversas especies (algodón, maíz, girasol, trigo, etc).

La tolerancia a la desecación está dada por la síntesis de proteínas y azúcares específicos que aunque se sintetizan durante las fases iniciales del desarrollo, cuando el contenido de ácido abscísico es aún elevado, su acumulación se acelera durante la deshidratación, alcanzando el

máximo en la madurez; debido a esto, las proteínas se conocen como abundantes en embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés).

En el caso de la semilla de chile, existen pocos estudios de la presencia y actividad de este grupo de proteínas durante la fase de la desecación, especialmente los trabajos de Kim *et al.* (2005) y Vidigal *et al.* (2009), quienes identificaron miembros de familias de las LEAs en semilla de *Capsicum annuum*, sin embargo, ellos trabajaron en semillas del llamado “Sweet Pepper”; las semillas de este tipo de chile tienen un periodo de desarrollo menor a 70 DDA, mientras que las semillas de chile Ancho y Guajillo el ciclo se completa hasta los 140 DDA, es decir el doble de tiempo.

En nuestra investigación el protocolo usado (modificado de Vidigal *et al.*, 2009) permitió la identificación de al menos dos proteínas P1 y P2 (Figura 11 y 12) miembros de la familia de las LEAs que pudieran estar correlacionadas con mayor germinación y vigor.

P1 tiene un peso de aproximadamente 65 kDa y P2, que muy probablemente sea la misma proteína que encontró Vidigal *et al.* (2009) en semillas de chile tipo “Sweet Pepper” tiene un peso aproximadamente 50 kDa.

Al encontrarse esta proteína en 3 tipos contrastantes de *Capsicum annuum*, podemos considerar que muy probablemente sea constante en la especie.

Existen al menos dos proteínas LEAs más reportadas en la literatura las cuales juegan un papel importante en la germinación y vigor de la semilla del *Capsicum annuum*, estas son proteínas de 30 kDa reportada por Vidigal *et al.*, (2009) que en las semillas de chile Ancho y Guajillo (Figura 11 y 12) aparecen constante y que por lo tanto no juega un papel relevante para la germinación y vigor; la otra proteína reportada por Kim *et al.* (2005) es una proteína de 18 kDa la cual juega un importante papel en la calidad fisiológica de la semilla del tipo de chile no especificado.

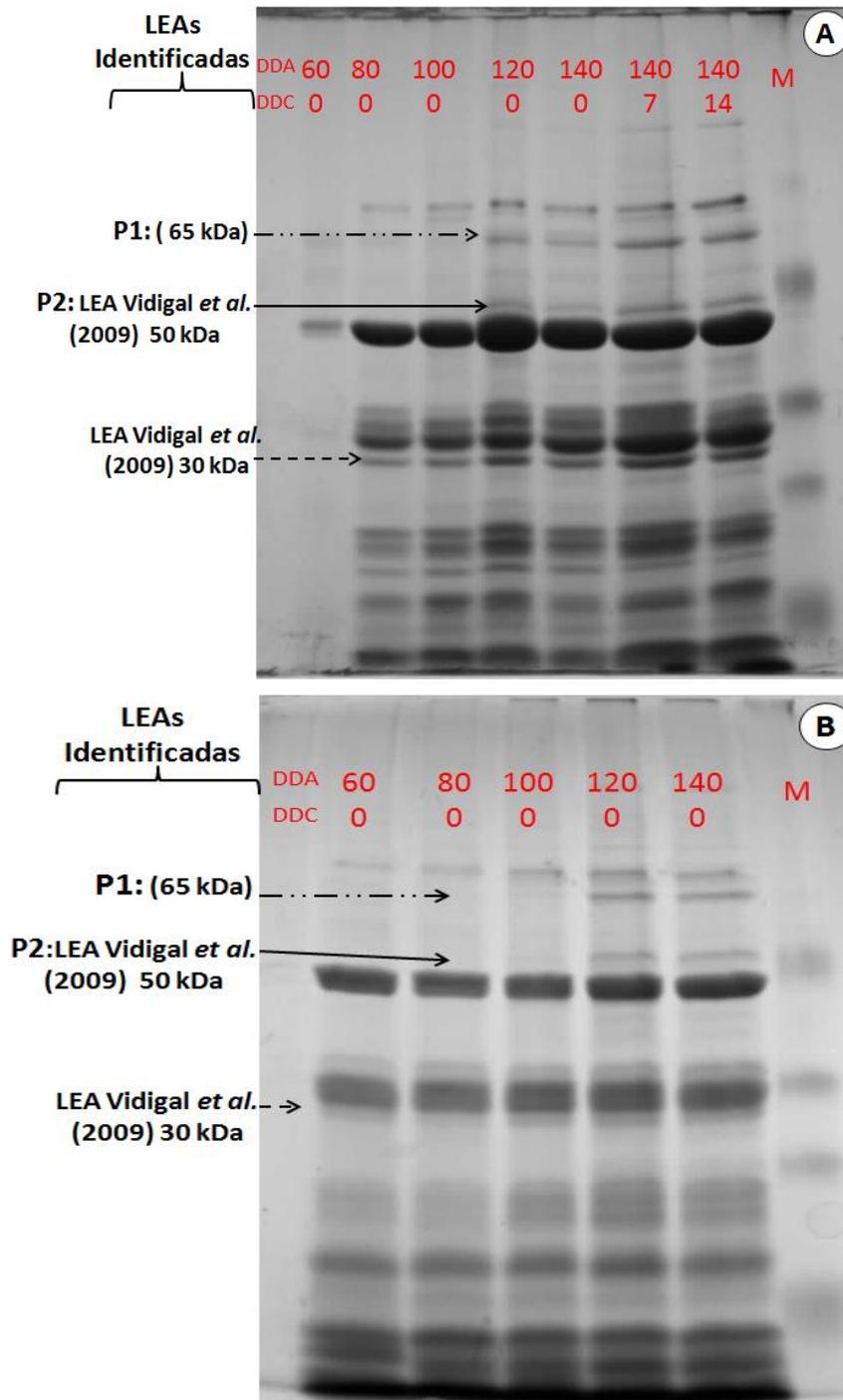


Figura 11. Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión de Chile Ancho (A) y Guajillo (B) los embriones fueron extraídos de la semilla con 60, 80, 100, 120 y 140 DDA en frutos sin almacenamiento postcosecha 0 DDC.

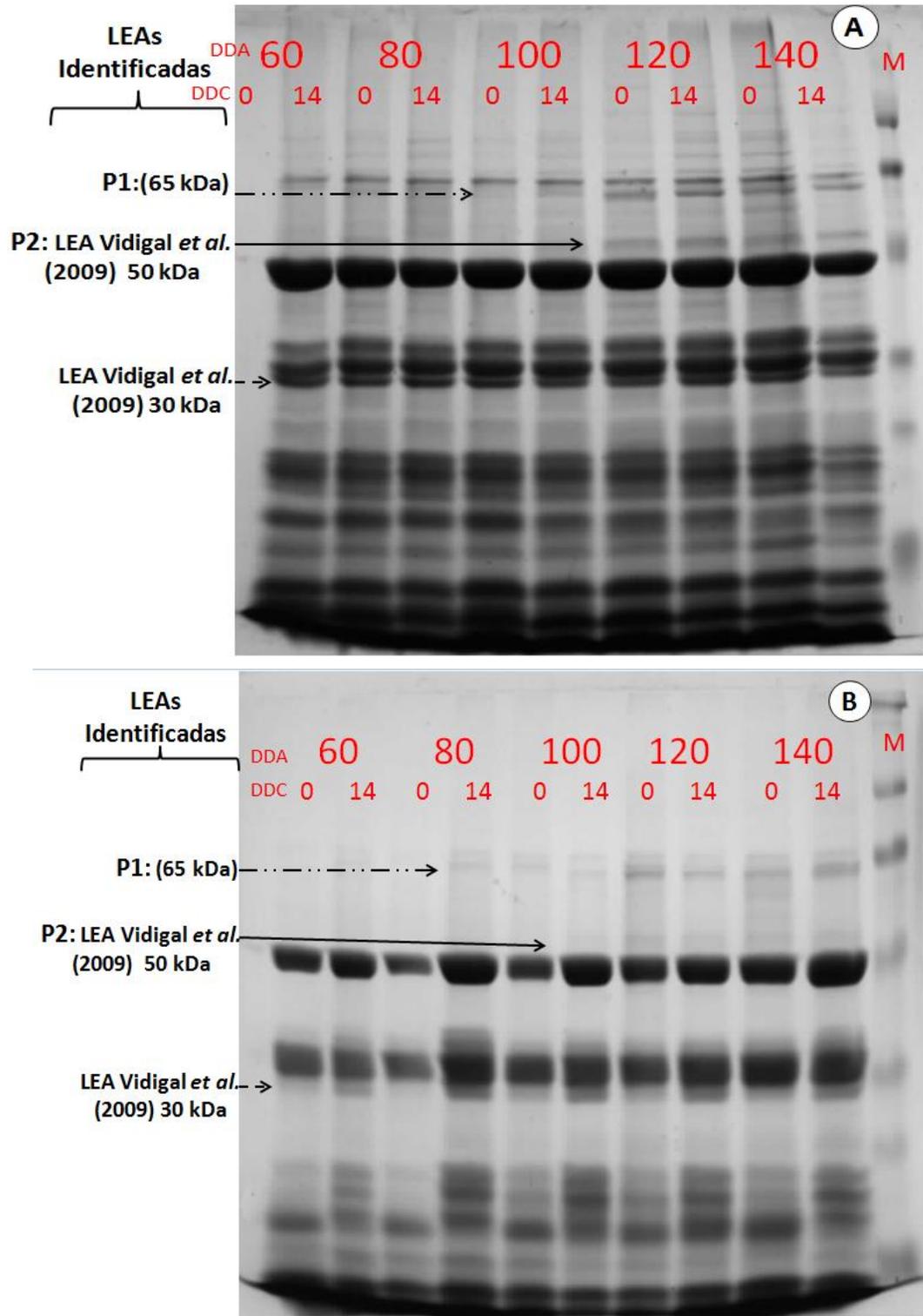


Figura 12. Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión de chile Ancho (A) y Guajillo (B) los embriones fueron extraídos de la semilla con 60,

80, 100, 120 y 140 DDA de furos sin almacenamiento postcosecha 0 DDC y 140 d de almacenamiento postcosecha.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

La calidad de la semilla es un factor de gran importancia para optimizar la producción agrícola. El desarrollo de los atributos de calidad, específicamente germinación y vigor, en semilla de chile han sido poco estudiadas y no obstante que México es el centro de domesticación de *C. annuum* y poseer una enorme variabilidad de tipos, los trabajos de investigación existentes se han realizado sobre todo es variedades de poca importancia en México. En esta investigación se pretende tener amplio el conocimiento del proceso de maduración de la semilla en dos de los tipos de chile más importantes de México, lo que permitirá optimizar la obtención de semilla de calidad.

El desarrollo de la semilla se ha dividido en 3 fases: histodiferenciación, acumulación de reservas y tolerancia a la desecación. Estas fases se pueden sobreponer en algunos periodos del desarrollo.

A los 40 DDA, las semillas extraída inmediatamente (frutos con 0 DDC) probablemente se encontraban en fase de histodiferenciación, ya que no germinaron en absoluto, además su peso expresado por P1000S semillas fue el más bajo (Figura 5) y su contenido de humedad (H) el más alto. Solo alrededor del 15 % del peso total de las semillas era materia seca (Figura 5). De igual manera los tratamientos de 7 y 14 DDC de 40 DDA no germinaron aunque P1000S aumento significativamente. Durante la fase de histodiferenciación, los fotosintatos que llegan a la semilla primero se utilizan en la división y crecimiento celular además en la organogénesis es necesario primero crear “una red” o estructura paredes y membranas celulares que serán “llenadas” conforme la semilla se desarrolle.

A los 60 DDA y 0 DDC para ambos tipos de chile, la germinación sigue siendo de 0 % y en semillas de Guajillo provenientes de frutos almacenados 7 DDC existe solo el 21 % de germinación (G), similar al porcentaje alcanzado por la semilla de chile Ancho proveniente de frutos con el 14 DDC. En semilla de Guajillo de frutos con el 14 DDC G llega hasta 47 %. En los tratamientos donde no existió germinación, podemos observar que su P1000S (Figuras 5A y 5B) es el más bajo de todos y la conductividad eléctrica (CE), la más alta (Figuras 10A y 10B). Estas semillas se encontrarían en la etapa donde aún no alcanzaban desarrollo morfológico y fisiológico que permitiera una germinación adecuada (Otho *et al.*, 2007).

Parecería que en chile Ancho, cuando el P1000S es superior a 8.2 g (60 DDA y 14 DDC) la semilla comienza a germinar; lo mismo sucede en chile Guajillo si P1000S alcanza 5.3 g. De la misma forma, el inicio de la germinación en semilla de chile Ancho se asocio con valores de conductividad eléctrica es de  $472.5 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  (60 DDA y 14 DDC) y para Guajillo de  $679.3 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  (60 DDA y 7 DDC). Lo anterior significa que a partir de 60 DDA y 14 DDC, en el caso de chile Ancho, un porcentaje de embriones tenían la capacidad de germinar; incluso antes de la acumulación del máximo peso. Sin embargo, no puede considerarse una etapa óptima para cosechar la semilla porque el mayor porcentaje de las semillas no habían completado su madurez. Además, es muy probable que las semillas estuvieran en acumulación de las reservas.

En cuanto a la fase de acumulación de reservas, determinar su inicio en este trabajo no es factible con el protocolo seguido y las variables evaluadas, pues la semilla crece de manera exponencial desde el primer muestreo en ambos tipos de chile (Figura 5). En cambio el final de la acumulación de las reservas seguramente se da cuando el P1000S deja de incrementarse (sub capítulo 5.2; Figuras 5A y 5B).

Durante el periodo de acumulación de reservas el contenido de agua de la semilla gradualmente disminuye y el agua es desplazada por la deposición o depósitos de compuestos de

reservas que son insolubles. En ese momento, una serie de eventos bioquímicos suceden en la semilla y la llevan a adquirir la capacidad de sobrevivir en condiciones de baja humedad. En el caso de la semilla de chile Ancho la disminución del contenido de humedad de la semilla recién extraída (Figura 3A) llega un límite (alrededor de 47 %) y es bajo esas condiciones, de alta humedad, que el proceso de adquisición de tolerancia a la desecación se da pues una vez extraída la semilla puede germinar lo que indicaría que su desarrollo se completo satisfactoriamente. De acuerdo con Bewley *et al.* (2013), el secado de la semilla ha sido un proceso al que tradicionalmente se le ha difundido poca importancia, sin embargo, estudios recientes han demostrado que es un proceso de gran importancia para la conservación de la semilla y su vigor.

Tradicionalmente, se considera que la madurez fisiológica de la semilla coincide con los valores máximos de peso, germinación y vigor. En este trabajo se puede constatar que el almacenamiento postcosecha de 14 DDC mejora las características de germinación y vigor en general. Es a partir de 80 DDA en ambos tipos de chile donde se alcanzan los valores de germinación que se consideran semillas de alta calidad para el comercio (93 % en Ancho y 96 % en Guajillo) y de alto vigor (90 % y 96 % de G-EA y 5.6 y 6 radículas d<sup>-1</sup> de VE en chile Ancho y Guajillo, respectivamente), manteniendo uno de los P1000S máximo.

Estos valores de alta calidad fisiológica coinciden con la aparición de la proteína P1 en específico para chile Guajillo (Figura 12B). A partir de los 100 DDA en chile Ancho la G del tratamiento 0 DDC es aún significativamente más baja que 7 y 14 DDC, donde P1 aparece con mayor nitidez, en tanto que la proteína P2 aparece con mayor nitidez a los 120 DDA en la semilla de ambos chiles y en todos los tratamientos postcosecha.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 6.1 Conclusiones

El contenido de humedad de la semilla al interior del fruto disminuye a lo largo de su desarrollo en Chile Guajillo hasta llegar a niveles de 17 % en el momento de la cosecha a los 140 d después de anthesis (DDA), lo cual contrasta con la semilla de Chile Ancho donde la humedad se estabiliza alrededor del 46 % a partir de los 80 DDA. El crecimiento del peso de la semilla en los dos tipos de Chile tiene dos fases importantes, la primera de un rápido crecimiento, la cual culmina a los 80 DDA y otra de muy lento crecimiento o estabilidad; la semilla de Ancho es más pesada que la de Guajillo, el peso de mil semillas (P1000S) a los 140 DDA fue en promedio 11.3 y 8.9 g en Chile Ancho y Guajillo, respectivamente. En las primeras fases del desarrollo (hasta los 80 DDA), dejar la semilla al interior del fruto cosechado durante 7 y 14 d provoca un incremento del P1000S y el peso volumétrico, pero en etapas posteriores no existe diferencia con las semillas extraídas de frutos sin almacenamiento postcosecha.

En semillas extraídas inmediatamente la máxima germinación y vigor siguieron una tendencia de incremento sigmoïdal hasta alcanzar un máximo a los 120 DDA. Estas variables fueron las más fuertemente afectadas por el almacenamiento postcosecha del fruto. A partir de los 80 DDA en frutos almacenados 14 d es posible obtener semillas con calidad fisiológica muy alta: germinación superior al 92 % y valores mayores a 5.6 radículas d<sup>-1</sup> de velocidad de emergencia de radículas, 90 % de germinación de semilla envejecida y 322.89  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en ambos tipos de Chile. Dos proteínas LEA de 65 y 50 kDa se correlacionaron con el desarrollo de la capacidad germinativa y el vigor en las etapas finales del desarrollo de la semilla a partir de los 100 DDA.

En ambos tipos de chile, se recomienda la cosecha de semilla a los 80 DDA si se tiene la infraestructura para almacenar al menos 14 d los frutos cosechados o a los 120 DDA con una extracción inmediata de la semilla.

## 6.2 Perspectivas

En este estudio se confirmaron datos obtenidos por Ayala et al. (2014) en ambos tipos de chile y se ampliaron los conocimientos sobre el efecto del almacenamiento de fruto (14 d) además de evaluar variables moleculares y bioquímicas que aportan información nueva y relevante.

Los resultados permiten reducir el tiempo en experimentos de mejoramiento genético reduciendo la duración del ciclo de selección y además durante la producción de semilla comercial, pues se garantiza una mayor calidad de la semilla obtenida en menor tiempo.

En trabajos posteriores se propone estudiar tres aspectos:

1. Tratamientos con mayor tiempo de almacenamiento postcosecha. Este tipo de experimentos utilizan una gran cantidad de frutos por lo cual se recomienda usar únicamente los tratamientos de 60, 80 y 100 DDA.
2. En cuanto a las técnicas usadas, para el estudio de proteínas LEA se propone modificar la densidad de geles para aislar proteínas con menor peso molecular ya que estas proteínas se caracterizan por pesos moleculares pequeños, así mismo aislar y secuenciar LEAs específicas del embrión de *C. annuum* L. o conseguir los marcadores específicos de estas proteínas ya caracterizadas y contrastarlos en chile Guajillo y Ancho.
3. Se sugiere estudiar la evolución del color de fruto con un estudio detallado de análisis de imágenes, el objetivo sería identificar el color en el que se obtenga semilla de alta calidad.

4. Evaluar otras variable bioquímicas tales como los azúcares presentes en la semillas durante su maduración

## VII. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rincón, V. H.; T. Corona Torres; P. López López; L. Latournerie Moreno; M. Ramírez Meraz; H. Villalon Mendoza y J. A. Aguilar Castillo. 2010. Los Chiles de México y su Distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. México. 114 p.
- Alfenas, A.C. (2006). *Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos*. (Electrophoretical and biochemical markers in plants and microorganisms). 2 ed. Viçosa: UFV, 627p.
- Álvarez López G. M. 2008. Producción, comercio y certificación de semillas en México. Centro de estudios para el desarrollo rural sustentable y la soberanía alimentaria. DESANR: 02
- Antonious, G. F.; T. Berke and R. L. Jarret. 2009. Pungency in *Capsicum chinense*: variation among countries of origin. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 44:179-184.
- Association of Official Seed Analysts – AOSA (1983). Seed vigor testing handbook. East Lansing, 93p. (Contribution, 32).
- Ayala Villegas M.J., O. J. Ayala Garay, Aguilar Rincón V.H. y T. Corona-Torres. 2014. Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annum* L. durante su desarrollo en el fruto. *Fitotecnia Mexicana*, 37 (1): 79–87.
- Baker, J., Steel, C. and Dure, L., III (1988). Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11, 277–291.
- Bewley Derek, J., Brandford, K., Hilhorst, H., and Nonogaki H. 2013. *Physiology of development, germination and dormancy*. 3<sup>rd</sup> edition. Springer. New York.

- Bewley, J. D and M. Black. 2000. Seed Technology and its Biological Basis. Sheffield Academic Press Ltd. Sheffield, England. 419 p.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. 2 ed. New York, Plenum Press, 445 p.
- Bino, R. J., H. Jalink, M. O. Oluoch and S. P. C. Groot. 1998. Seed research for improved technologies. *Scientia Agricola* 55:19-26.
- Blasiak, J.; A. Kuang; C. S. Farhangi and M. E. Musgrave. 2006. Roles of intra-fruit oxygen and carbon dioxide in controlling pepper (*Capsicum annuum* L.) seed development and storage reserve deposition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 164-173.
- Bosland, P. W. 1992. Chiles: a diverse crop. *HortTechnology* 2 (1):6-10.
- Bosland, P. W. and E. J. Votava. 2000. Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. CABI Publishing. New York. U.S.A. 204 p.
- Bradford K and H Nonogaki. 2007. Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 367 p.
- Bradford, K. J. 2004. Seed Production and Quality. Department of Vegetable Crops. University of California. Davis, California, U.S.A. 134 p.
- Bringel J. M. M.; M. H. D. Moraes; J. O. M. Menten and I. P. Bedendo, 2001. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja produzidas na Região de Balsa, Maranhão. *Summa Phytopathologica, Jaboticabal* 27: 438-441.
- Buitink, J.; F. A. Hoekstra and O. Leprince. 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. *In: Black M, Pritchard, HW, eds, Dessication and Survival in Plants. Drying Without Dying*. CABI Publishing, Wallingford, U. K. pp: 293-318.

- Cervantes S., T. 1967. Algunos resultados de las experiencias obtenidas en la producción de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis Profesional. Chapingo, Mexico. pp. 3-6.
- Cochrane, M. P. 2000. Seed carbohydrates. *In*: Black M, Bewley, J.D. (eds.) Seed Technology and its Biological Basis. Sheffield Academic Press. Sheffield, U. K. pp. 85-120.
- Colmenero- Flores, J. M., Moreno, L. P., Smith, C. E. and Covarrubias, A. A. (1999). Pvlea- 18, a member of a new late- embryogenesis- abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of wellirrigated bean seedlings. *Plant Physiology* 120, 93–104.
- Copeland, L. O. and M. B. McDonald. 2001. Principles of Seed Science and Technology. 4th Ed. Burgues Publishing Company. pp: 122-169.
- Demir, I. and Ellis, R.H. (1992a). Changes in seed quality during seed development and maturation in tomato. *Seed Science Research*, 2, 81-87.
- Demir, I. and Ellis, R.H. (1992b). Development of pepper (*Capsicum annuum*) seed quality. *Annals of Applied Biology*, 121, 385-399.
- Demir, I., Mavi, K., Sermenli, T. and Ozcoban, M. (2002). Seed development and maturation in Aubergine (*Solanum melongena* L.). *Gartenbauwissenschaft*, 67, 148-154.
- Dias, D. C. F. S., F. P. Ribeiro, L. A. S. Dias, D. J. H. Silva and D. S. Vidigal. 2006. Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. *Seed Science and Technology* 34:691-699.
- Doijode S. D. 1988. Seed storability as affected by different stages of fruit development in chilli. *Veg. Sci.* 15: 15-20.
- Doijode, S. D. 1991. Influence of seed position in fruit on seed viability and vigour during ambient storage of chilli fruits. *Capsicum* Newsletter 10: 62-63.

- Doijode, S. D. 2001. Seed Storage of Horticultural Crops. Haworth Press. New York, USA. 339 p.
- Dure, L., III (1993). Structural motifs in Lea proteins. In “Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress” (T. J. Close and E. A. Bray, eds.), pp. 91–103. American Society of Plant Physiologists Series, USA.
- Edwards, R. L. and F. J. Sundstrom. 1987. Afterripening and harvesting effects on Tabasco pepper seed germination performance. *HortScience* 22:473-475.
- Fenner, M. 2000. Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities. 2<sup>nd</sup> Edition. CABI Publishing. London, UK. 410 p.
- George, R.A.T. 1999. Vegetables seed production. “nd Edition. CABI publishing. Ney York. 328 p.
- Hernández, C. D. 1990. Evaluación de la calidad de semillas a diferentes grados de madurez del fruto en relación a periodos de fermentación en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) c.v. Rio Grande. Tesis Profesional. Nuevo León, México. pp. 84-89.
- Hernández, L. A. 2012. Apuntes del Curso de Análisis de Semillas. Posgrado de Semillas. IREGEP. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Hernández-Verdugo, S.; P. Dávila A. y K. Oyama. 1999. Síntesis del conocimiento taxonómico, Origen y Domesticación del Género *Capsicum*. Boletín de la Sociedad Botánica de México 64: 65-84.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. and Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 431–438.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 47,377–403.

- International Seed Testing Association (ISTA). 2004. International rules for seed testing. Bassersdorf, CH-Switzerland.
- Kermode, A. R. 1995. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. *In*: J. Kigel, G. Galili, Eds. Seed Development and Germination. Marcel Dekker, Inc. New York. pp: 273-332.
- Kermode, A.R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed developed germination. *Crit. Rev. Plant Science* 9:155-195.
- Kim HS, Lee JH, Kim JJ, Kim CH, Jun SS, Hong YN. 2005. Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene* 344: 115–123
- Laborde, J. A. and E. P. Rendón. 1989. Tomatoes and Peppers in Mexico: Commercial Production and Research Challenges. *In*: S.K. Green (ed.). Tomato and Pepper Production in the Tropics, AVRDC, Shanhua, Tainan, pp: 521-535.
- Long-Solís, J. 1986. Capsicum y su Cultura. La Historia del Chilli. Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México. México. 181 p.
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber A. 1975. The germination of seeds. Ed. 2a edition, Pergamon. Gran Bretaña. 192 p.
- Metha, V.A. and Ramakrishna, V. 1986. Effect of different pickings on the storability of chilli seeds. *Madras Agric. J.* 75: 334-339.
- Namesny L., A. 2006. Compendios de horticultura: Pimientos. Ediciones de Horticultura SI. Barcelona, España. 254 p.

- Navarro, R. J.; 1990. Efecto de diferentes grados de madurez del fruto y periodos de fermentación sobre la calidad de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) c.v. Fleradade en Marin, N.L. Tesis Profesional Nuevo León, México. pp. 90-93.
- Nuez, F., R. Gil Ortega y J. Costa. 2003. El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajés. Ediciones Mundi-Prensa Madrid-España. 586 p.
- OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico). 2012. .síntesis de las normas internacionales que regulan el comercio de semillas. [En línea] [www.oecd.org/tad/seed](http://www.oecd.org/tad/seed). Fecha de consulta: 30 de Septiembre 2013.
- Otho M. A., S. L. Stone and J. J. Harada (2007) Genetic control of seed development and seed mass. *In: Seed Development, Dormancy and Germination*. K J Bradford, H Nonogaki (eds). Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp: 1-49.
- Pérez-Camacho, I., V. A. González-Hernández, J. C. Molina-Moreno, O. J. Ayala-Garay y A. Peña-Lomelí. 2008. Efecto de desarrollo y secado de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot. en germinación, vigor y contenido de azúcares. INCI 33(10):762-766.
- Peterbauer, T and A. Richter. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11:185-197.
- Pichardo, G. J. M.; Ayala, G. O. J.; González, H. V.; Flores, O. C. M. 2014. Fatty acids and physiological quality of tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.) seed during natural ageing. *Chilean journal of agricultural*, 74 (4): 391-396.
- Pichardo, G. J. M.; Ayala, G. O. J.; González, H. V.; Flores, O. C. M.; Carrillo S. J. A; Peña L. A. y Robledo, P. A. 2010. Calidad fisiológica, ácidos grasos y respiración en semillas de tomate de cáscara deterioradas artificialmente. *Rev. Fitotec. Mex.* 33:231-238.

- Pittcock, K. J. 2008. Seed production, processing and analysis In: plant propagation. Caula, A. B. and Robert, N. T. (eds.). Editorial CRC Press Taylor and Francis Group. USA. 401-406 pp.
- Pozo, O. 1981. Descripción de Tipos y Cultivares de Chile (*Capsicum spp.*) en México. INIA, Ciudad de México. México. 40 p.
- Randle, W. M. and S. Honma. 1981. Dormancy in peppers. *Scientia Horticulturae* 14:19-25.
- Robles H., J. 1992. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosfórica en el rendimiento y calidad de la semilla de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) c.v. Hidalgo. Tesis Profesional Nuevo León, México.
- Rodríguez Burgos A, O. J. Ayala Garay, Hernández Livera A, V. M. Leal León1 y E. Cortez Mondaca. 2011. Desarrollo de fruto y semilla de cinco variedades de tomate de cáscara en Sinaloa. *Ciencias Agrícolas*. 2: 51: 673-687
- Salunkhe, D. K. 2003. Tratado de Ciencia y Tecnología de las Hortalizas: Producción, Composición, Almacenamiento y Procesado. Editorial ACRIBIA S. A. Zaragoza, España. 739 p.
- Sánchez, V. M., F. J. Sundstrom, G. N. McClure and N. S. Lang. 1993. Fruit maturity, storage and postharvest treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia Horticulturae*, 54:191-201.
- SAS. 2003. Statistical Analysis System. Version 9.1.3 SAS Institute Inc., Cary, N. C. USA.
- Sayed, M. S. and M. Essam. 1952. Viability of seeds harvested from fruits at different stages of maturity. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* 60: 327-329.
- Shih M-D.; F. A. Hoekstra and Hsing C. Y.-I. 2008. Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Advances in Botanical Research*, 48: 212-240.

- SIAP. 2013. Anuario de la Producción Agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [En línea] Disponible en <http://www.siap.gob.mx>. Fecha de consulta: 27 de Enero 2014.
- Smith, P. G.; B. Villalon and P. L. Villa. 1987. Horticultural classification of pepper grown in the United States. *HortScience* 22:11-13.
- Taiz L. and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5th Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. 764 p.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5<sup>th</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 764 p.
- Valadez, L. A. 1993. *Producción de Hortalizas*. Editorial LIMUSA. Ciudad de México, México. 298 p.
- Vidigal, D. S., D. C. F. S. Dias, E. R. V. Von Phino and L. A. S. Dias. 2009. Seed Pepper seed quality and leaf-protein activity in relation to fruit maturation and post-harvest storage. *Seed Science and Technology* 37: 192-201.
- Vieira, C. P.; R. D. Vieira and J. H. N. Paschoalick, 1994. Effects of mechanical damage during soybean seed processing on physiological seed quality and storage potential. *Seed Science and Technology* 22: 581-589.
- Wall, A. D.; R. Kochevar and R. Phillips. 2002. *Chile Seed Quality*. New Mexico Chile Task Force. Report 4. New Mexico State University and US Department of Agriculture. U.S.A. 6 p.
- Welbaum, G.E and Bradford, K.J. (1988). Water relations of seeds development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). I. Water relations of seeds and fruit development. *Plant Physiology*, 86, 406-411.

Wien, H. C. 1999. Peppers. *In*: Wien, H. C. (ed.). *The Physiology of Vegetable Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp: 259-293.

Wurr, D. C. E. and J. R. Fellows. 1983. The effect of the time of seedling emergence of crisp lettuce on the time of maturity and head weight at maturity. *Journal of Horticultural Science* 58:561-566.

## VIII. ANEXOS

### 7.1 Conducción del Experimento.



Figura 13 Conducción del experimento en invernadero



Figura 14 Flores en antesis



Figura 15. Fruto etiquetado



Figura 16 Extracción se semillas



Figura 17 Embriones extraídos



Figura 18. Semillas germinadas

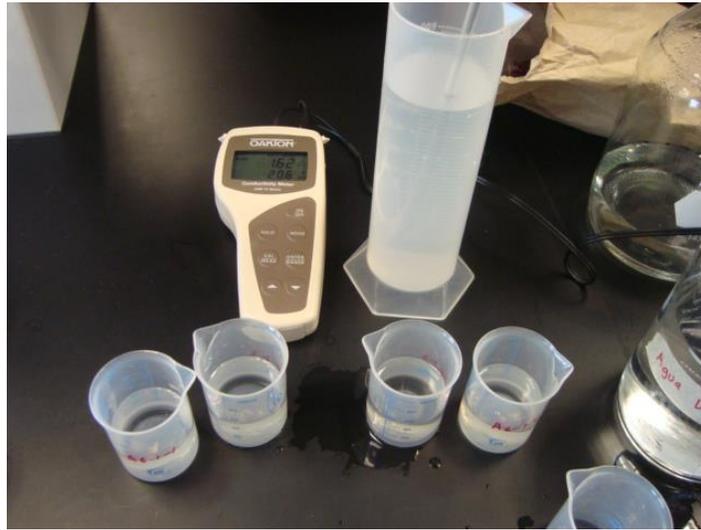


Figura 19 Materiales de conductividad eléctrica



Figura 20 Envejecimiento acelerado

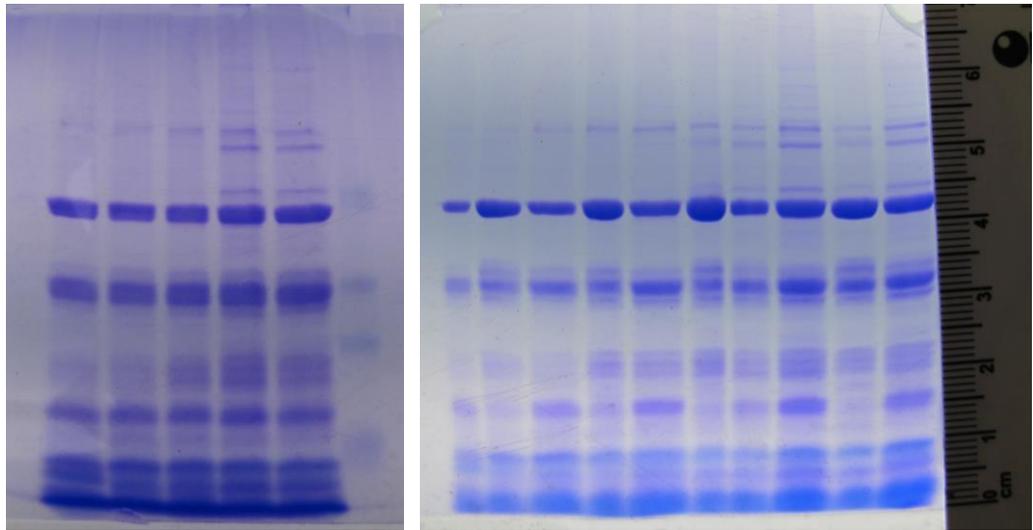


Figura 21 Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión