



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

Caracterización bioquímica y molecular de las colectas centrales de chile guajillo y pasilla

VERÓNICA TRUJILLO PAHUA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

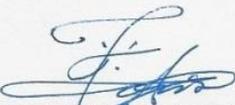
Julio, 2015.

La presente tesis titulada: **Caracterización bioquímica y molecular de las colectas centrales de chile guajillo y pasilla**, realizada por la alumna: **Verónica Trujillo Pahua** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENETICA

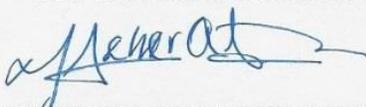
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



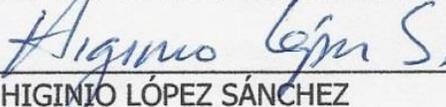
DR. TARSICIO CORONA TORRES

ASESOR



DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESOR



DR. HIGINIO LÓPEZ SÁNCHEZ

ASESOR

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LAS COLECTAS CENTRALES DE CHILE GUAJILLO Y PASILLA

Verónica Trujillo Pahua, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

La diversidad de chiles en México es amplia y su uso tiene gran importancia en la gastronomía. Los chiles tipo guajillo, pasilla y puya figuran entre los más utilizados para la preparación de platillos regionales. Una de las formas para conocer y cuantificar su diversidad es mediante la caracterización, ya sea a nivel bioquímico, molecular o morfológico. En particular, la caracterización a nivel bioquímico permite identificar y cuantificar metabolitos secundarios de interés, en tanto que a nivel molecular se puede obtener información de la estructura genética de las poblaciones y parámetros de diversidad, entre otros. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se ha enfocado en muestras que no siempre representan claramente la variación dentro de un tipo de chile, por lo que es necesario realizar estudios con un número mayor de accesiones representativas, utilizando colectas centrales, para generar una base amplia de conocimiento. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue realizar una caracterización bioquímica y molecular de dos colectas centrales, una de chile guajillo (15 poblaciones) y otra de chile pasilla (11 poblaciones), además de cinco accesiones de chile puya. La caracterización bioquímica se hizo mediante espectrofotometría y cromatografía de líquidos de alta resolución y la molecular se realizó con 15 loci de microsatélites. En cuanto a la caracterización bioquímica, el chile puya mostró el mayor contenido de capsaicinoides, y el chile pasilla presentó el mayor contenido de carotenoides y de flavonoides. Se observó una amplia variabilidad en el contenido de los metabolitos secundarios cuantificados. También se encontró un comportamiento diferencial en

los dos ambientes. En relación al color, el chile pasilla presentó un color rojo oscuro, y el chile guajillo y puya un rojo claro brillante. Por otro lado, en la caracterización molecular de las poblaciones de chile se detectaron 137 alelos, 7.67 alelos por locus para el chile guajillo, 6.47 alelos para pasilla y 5.27 para puya, y un polimorfismo general de 88.9%. Se encontró un exceso de heterocigotos en sus poblaciones. Los estadísticos de F indicaron que la variación es mayor dentro de tipos de chile que entre tipos de chile. En el análisis de componentes principales se formaron cuatro grupos, coincidiendo con el análisis de conglomerados para las mismas poblaciones, lo que indica que las poblaciones dentro de un mismo grupo comparten los mismos alelos. La similitud esperada entre chile guajillo y chile puya no fue visible, ya que el chile guajillo comparte alelos con algunas poblaciones de chile pasilla y éste último comparte alelos también con chile puya, sin existir relación genética con este análisis entre guajillo y puya. La diversidad bioquímica y molecular que se encontró en este estudio permite identificar la variabilidad entre y dentro de los chiles guajillo, pasilla y puya, misma que podría ser utilizada en programas de conservación y mejoramiento genético.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, caracterización, diversidad, metabolitos secundarios, microsátélites.

**BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CORE
COLLECTIONS OF CHILE GUAJILLO AND PASILLA**

Verónica Trujillo Pahua, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The diversity of chiles in Mexico is large and their use is of great importance in gastronomy. Chiles guajillo, pasilla and puya are among the most used in the preparation of regional dishes. One way of identifying and quantifying *Capsicum* diversity is by characterizing it, at biochemical, morphological or molecular level. Particularly, a biochemical characterization allows to identify and quantify secondary metabolites of interest, while a molecular characterization gives information about the genetic structure of populations, genetic diversity parameters, among other pieces of information. However, most of these studies have focused on a small number of accessions that do not clearly show the variation within a type of chile. Thus, it is necessary to carry out studies using a larger number of representative populations, using core collections, to generate a broad base of knowledge. Therefore, the aim of this study was to biochemically and molecularly characterize a core collection of chile guajillo (15 accessions), another of pasilla (11 accessions), and five additional accessions of chile puya. Biochemical characterization was performed using spectrophotometry and high pressure liquid chromatography, and molecular characterization was carried out with 15 microsatellite loci. As for the biochemical characterization, chile puya had the highest capsaicinoids content, and the pasilla type had the highest content of carotenoids and flavonoids. It was found that the core collections had a wide variability in the content of secondary metabolites. A differential behavior

was also found in the two environments evaluated. Regarding to the color, pasilla type had a dark red color, and chiles guajillo and puya a bright light red. On the other hand, in the molecular characterization of chile accessions, 137 alleles were detected, 7.67 alleles per locus for chile guajillo, 6.47 alleles for chile pasilla, and 5.27 alleles for chile puya, and an overall polymorphism of 88.9%. An excess of heterozygotes was found in chile accessions. The F statistics showed that the variation is greater within chile accessions from the same type that it is among types of chile. The principal component analysis resulted in four groups, coinciding with the dendrogram for the same accessions, which indicates that accessions within the same group share the same alleles. The expected similarity between chile guajillo and chile puya was not visible, since chile guajillo shares alleles with some pasilla accessions and the latter also shares alleles with chile puya, without showing a clear genetic relation between chiles guajillo and puya in this study. Biochemical and molecular diversity found in this study allows to identify the variability among types of chile and within chiles guajillo, pasilla, and puya, and this germplasm variability could be used in conservation and breeding programs.

Keywords: *Capsicum annuum*, characterization, diversity, microsatellite, secondary metabolites.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Montecillo**, y en particular al Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad en el área de Genética, por darme la oportunidad de pertenecer a él y aprender del conocimiento y experiencia de su destacada plantilla de docentes.

A la **Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI)**, que brindó el financiamiento para esta investigación, a través de la Red de Chile.

A mi consejo particular **Dr. Tarsicio Corona Torres, Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón y Dr. Higinio López Sánchez**, por sus enseñanzas, paciencia, guía y facilidades otorgadas para realizar esta investigación.

A la **Fundación Czeslawa Prywer**, a través de los **Dres. Héctor Lozoya Saldaña y Víctor González Hernández**, por el apoyo económico complementario posterior a la beca CONACYT para terminar mi proyecto de tesis.

A los **Dres. Amalio Santacruz Varela, Víctor González Hernández y Armando García Velázquez**, por permitirme realizar las determinaciones en los laboratorios de **Huella Genética, Fisiotecnia Vegetal, y Citogenética**, respectivamente. Agradezco también a sus equipos de trabajo: **Laura Carrillo Reyes, Dr. Nicacio Cruz Huerta, Dr. Iván Ramírez Ramírez, Dra. Mariana Palma Tenango e Ing. Irma Sánchez Cabrera**, quienes brindaron el espacio, apoyo, orientación y sugerencias para el desarrollo de la investigación.

A mis amigas **Noemí Pérez Mendoza y Diana Garfias Sánchez** por su apoyo incondicional durante la investigación y a nivel personal.

DEDICATORIA

*A mi hija **Tania**, que siempre será lo más importante en mi vida, el mejor regalo de Dios y mi más grande orgullo y a **Gerardo** por su apoyo.*

*A mis padres **Odilia** y **Eduardo** por su incondicional apoyo, amor y enseñanzas, el reconocimiento es para ustedes por alentarme y ayudarme a lograr esta meta.*

*A mis hermanas **Alejandra** y **Liliana**, de quienes aprendo a seguir luchando, a mis sobrinos **Fernanda** y **Carlitos** que me llenan de alegría.*

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIA	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. OBJETIVOS.....	2
1.1.1. Objetivo general.....	2
1.1.2. Objetivos específicos.....	2
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1.2.1. Diversidad y recursos genéticos de <i>C. annuum</i>	3
1.2.2. Producción de <i>C. annuum</i>	4
1.2.3. Importancia de la caracterización de los recursos fitogenéticos de <i>C. annuum</i>	4
1.2.4. Compuestos bioquímicos en <i>C. annuum</i>	5
1.2.5. Capsaicinoides.....	7
1.2.5.1. Biosíntesis de capsaicinoides.....	8
1.2.6. Carotenoides.....	9
1.2.6.1. Biosíntesis de carotenoides.....	10
1.2.7. Flavonoides.....	11
1.2.7.1. Biosíntesis de flavonoides.....	12
1.2.8. Medición del color mediante colorimetría triestímulo.....	14
1.2.9. Análisis molecular.....	15
1.2.9.1. Marcadores moleculares.....	15
1.2.9.2. Microsatélites.....	17
1.3. REFERENCIAS.....	17
CAPÍTULO II	24
CAPSAICINOIDES, CAROTENOIDES, FLAVONOIDES Y COLOR EN FRUTO SECO DE LAS COLECTAS CENTRALES DE CHILE GUAJILLO Y PASILLA	24
RESUMEN.....	25
SUMMARY.....	26
2.1. INTRODUCCIÓN.....	27
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.2.1. Extracción y cuantificación de capsaicinoides.....	30
2.2.2. Extracción y cuantificación de carotenoides totales.....	31
2.2.3. Extracción y cuantificación de flavonoides totales.....	31

2.2.4. Determinación del color	32
2.2.5. Análisis estadístico	32
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
2.4. CONCLUSIONES	39
2.5. AGRADECIMIENTOS	40
2.6. REFERENCIAS	40
CAPÍTULO III.....	44
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN CENTRAL DE CHILE	
GUAJILLO Y PASILLA	44
RESUMEN	45
SUMMARY.....	46
3.1. INTRODUCCIÓN.....	47
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
3.2.1. Material vegetal.....	48
3.2.2. Extracción de DNA	50
3.2.3. Amplificación de los loci de microsatélites	50
3.2.4. Análisis de fragmentos y análisis estadístico	51
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.3.1. Diversidad Genética	52
3.3.2. Estructura genética	54
3.3.3. Relación entre poblaciones.....	56
3.4. CONCLUSIONES	60
3.5. AGRADECIMIENTOS	61
3.6. REFERENCIAS	61
CAPITULO IV	65
CONCLUSIONES GENERALES	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Procedencia y georreferenciación de las accesiones utilizadas.....	29
Cuadro 2.2. Comparación de medias entre y dentro de tipos de chile y localidades para las variables analizadas.....	35
Cuadro 2.3. Comparación mediante la prueba de t para las colectas en San Luis Potosí y Zacatecas.....	38
Cuadro 3.1. Procedencia de las poblaciones de chile guajillo, pasilla y puya.....	49
Cuadro 3.2. Loci de microsatélites, etiqueta y temperatura de alineamiento.	51
Cuadro 3.3. Parámetros de diversidad genética para los chiles guajillo, pasilla y puya.....	54
Cuadro 3.4. Estadísticos de F para las 31 poblaciones de chile guajillo, pasilla y puya.	56
Cuadro 3.5. Valores propios, proporción de varianza explicada, acumulada y alelos con mayor influencia para los primeros 7 componentes principales.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Rutas generales del metabolismo secundario (Dewick, 2002).....	6
Figura 1.2. Biosíntesis de capsaicina (Vázquez-Flota <i>et al.</i> , 2007).....	9
Figura 1.3. Biosíntesis de carotenoides (Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2013).....	11
Figura 1.4. Biosíntesis de flavonoides (Grotewold, 2006).	13
Figura 3.1. Dispersión de 31 poblaciones de Chile con base en los dos primeros componentes principales.	58
Figura 3.2. Dendrograma a partir de 137 alelos de SSRs de 31 poblaciones de <i>Capsicum annuum</i> . (PA: Poblaciones aisladas de guajillo; I-IV: Grupos).....	59

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum* spp.) pertenece a la familia Solanaceae, con cinco especies domesticadas (Moscone *et al.*, 2006), siendo *C. annuum* L. la más conocida y de mayor importancia económica a nivel mundial (Bosland, 1994). El género *C. annuum* presenta la mayor diversidad tanto en tipos cultivados como silvestres, y en México existen alrededor de 64 de ellos, entre los más destacados por su consumo se encuentran el tipo serrano, jalapeño, guajillo, pasilla y ancho, cultivados principalmente en el norte y el centro de México (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

Aunque hay una gran diversidad de chiles, existe el riesgo de perder ésta en forma parcial por factores bióticos y abióticos; para evitarlo es necesario conocer los recursos fitogenéticos a nivel de especie o población, mediante la caracterización morfológica, bioquímica y molecular. Lo anterior es importante para conocer sus características, clasificar los materiales y utilizarlos en programas de mejoramiento genético que permitan conservar los recursos. Entre los trabajos de caracterización en *C. annuum* están los morfológicos (Moreno-Pérez *et al.*, 2011), bioquímicos (Morán-Bañuelos *et al.*, 2008) y moleculares (Contreras *et al.*, 2011), que han aportado conocimiento valioso acerca de la diversidad dentro de la especie en diferentes tipos de chile.

La caracterización de especies o poblaciones se apoya en herramientas y técnicas diversas. En el caso de la caracterización morfológica comúnmente se utilizan descriptores (IPGRI, 1995), en la bioquímica una de las técnicas más comunes para determinar presencia y concentración de metabolitos secundarios es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Wahyuni *et al.*, 2011), y en la molecular actualmente se utilizan las técnicas basadas en el análisis de DNA como RFLPs, AFLPs, SSR, SNPs o QTLs (Bajaj, 1988).

En el caso particular de los chiles guajillo y pasilla, aunque son de los más consumidos en México, aún falta información en cuanto a su estructura genética y contenido de compuestos bioquímicos de interés, y han sido pocos los estudios en *C. annuum* realizados en algún tipo específico de chile, sin haber estudios en particular acerca de guajillo y pasilla. Por lo anterior y como parte de la necesidad de generar conocimiento de la diversidad en estos tipos de chile, el objetivo de esta investigación fue caracterizar bioquímica y molecularmente dos colectas centrales, una de chile guajillo (15 accesiones) y otra de chile pasilla (11 accesiones) para conocer su estructura y diversidad genética, además del contenido de algunos metabolitos secundarios de interés.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

- Realizar una caracterización molecular y bioquímica de las colectas centrales de los chiles guajillo y pasilla.

1.1.2. Objetivos específicos

- Cuantificar el contenido total de capsaicinoides, carotenoides y flavonoides, así como determinar el color de fruto seco de las colectas centrales de los chiles guajillo y pasilla.
- Caracterizar molecularmente las colectas centrales de chile guajillo y pasilla, mediante microsatélites (SSR), para determinar estructura y diversidad genética entre y dentro de tipos de chile.

1.1.3. Hipótesis

Existe amplia variación en el color y la concentración de metabolitos secundarios en los tipos de chile guajillo y pasilla.

En las colecciones núcleo de chile guajillo y pasilla existe una amplia diversidad genética dentro y entre poblaciones.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1. Diversidad y recursos genéticos de *C. annuum*

El término de diversidad genética dentro de una especie se define como el número total de características que ésta presenta, y la variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse, lo que permite la evolución de las especies. La mayor diversificación de una especie puede ocurrir en regiones diferentes a las de su origen, por lo que los centros de diversificación pueden no ser el centro de origen de una especie (CONABIO, 2014).

México ocupa el cuarto lugar dentro del grupo de los 17 países megadiversos, con una importante riqueza de endemismos y variabilidad genética, resultado de la diversificación natural y cultural del país (Piñero *et al.*, 2008). Estudios evolutivos sugieren que el origen de los chiles del género *Capsicum* fue en Bolivia sur central, con migración a los Andes y tierras bajas de la Amazonía, generando así su especiación (McLeod *et al.*, 1982; McLeod *et al.*, 1983).

En cuanto a las especies del género *Capsicum* se reconocen 31, con un número cromosómico básico $n=12$, excepto para *C. campylopodium*, *C. cornutum*, *C. lanceolatum*, *C. mirabile*, *C. romboideum*, *C. villosum* con un número básico de $n=13$ (Tong y Bosland 2003; Toniolo y Schifino-Wittmann, 2006; Moscone *et al.*, 2006). Del número total de especies de *Capsicum*, 5

de ellas son domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, y *C. pubescens* (Barboza, 2011; Moscone *et al.*, 2006).

De las cinco especies domesticadas, *Capsicum annuum* var. *annuum* es la más importante en México y el mundo, agrupa la mayoría de los tipos cultivados en el país y presenta gran diversidad en forma, color, sabor, pungencia y adaptación. Entre los tipos de chile más importantes se encuentran el chile ancho, serrano, jalapeño, morrón, mirasol, pasilla y mulato (Pozo *et al.*, 1991) y en México se encuentran hasta 64 tipos distintos de chile (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

1.2.2. Producción de *C. annuum*

La producción de chile verde a nivel mundial se estimó para el año 2013 en 31 131 225.56 t, siendo China el principal productor con 15 823 000 t en el mismo año. México se encuentra entre los primeros cinco países productores de chile en el mundo, con una producción de 2 294 400 t en 2013 (FAOSTAT, 2015). En una descripción detallada acerca de la producción de los chiles guajillo, pasilla y puya, SAGARPA-SIAP (2015) reporta que a nivel nacional el chile guajillo tuvo una superficie sembrada de 5 249 ha, con un rendimiento promedio de 1.79 t ha⁻¹ y un precio de venta de \$ 36 411.36 por tonelada; el chile pasilla tuvo una superficie sembrada de 2 913.50 ha, un rendimiento promedio de 1.59 t ha⁻¹ y un precio de venta de \$ 48 034.70 por tonelada; por último el chile puya con una superficie sembrada de 5 492 ha, un rendimiento de 1.61 t ha⁻¹ y un precio de venta de \$ 36 103.30 por tonelada.

1.2.3. Importancia de la caracterización de los recursos fitogenéticos de *C. annuum*

Realizar la caracterización en el germoplasma de una especie permite la conservación y la utilización de esos recursos genéticos en programas de mejoramiento (Rana *et al.*, 2014). Con la

caracterización se obtiene información general o específica de la variabilidad dentro de las poblaciones analizadas, en aspectos bioquímicos, morfológicos o moleculares.

La utilización de colecciones núcleo permite optimizar recursos y obtener información amplia de las poblaciones en estudio sin la repetición de colectas. Una colección núcleo es un conjunto limitado de accesiones que representa la diversidad genética de una especie cultivada o de sus parientes silvestres, la colección núcleo no reemplaza la población original de mayor tamaño de la cual se obtiene (Frankel, 1984; van Hintum *et al.*, 2003) y proporcionará una visión general de las características de la colección completa (van Hintum *et al.*, 2003).

Brown (1989) sugiere que la colección núcleo no sea mayor del 10% de la colección completa y debe tener al menos 70% de la variación contenida en dicha colección. La mayoría de las colecciones núcleo constan de entre 5% y 20% del tamaño de las colecciones de las cuales se extrajeron (van Hintum *et al.*, 2003).

En el caso de la especie *C. annuum* hay múltiples estudios enfocados a conocer su diversidad mediante la caracterización de germoplasma, por ejemplo desde los basados en cariotipos (Pickersgill, 1997) e isoenzimas (Loaiza-Figueroa *et al.*, 1989), hasta los análisis de diversidad a nivel de secuencia de nucleótidos en estudios evolutivos y genealogías de poblaciones (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009) y otros más enfocados en la diversidad intra e interespecífica (Hernández-Verdugo *et al.*, 2008).

1.2.4. Compuestos bioquímicos en *C. annuum*

Producto del metabolismo secundario, las plantas de algunos grupos taxonómicos producen compuestos no esenciales en la sobrevivencia del organismo pero con un papel importante para su sobrevivencia en el ecosistema, formados a partir de uno o más metabolitos primarios a través

de diferentes rutas biosintéticas (Figura 1.1). Éstos metabolitos secundarios proporcionan defensa, atracción y protección UV principalmente (Bennett, 1995).

Los diferentes compuestos fitoquímicos producidos por *C. annuum* derivados del metabolismo secundario proporcionan su color, sabor y picor, siendo estos los atributos más importantes cuando se le usa como especia en la gastronomía mexicana (Barceloux, 2009; Guzmán *et al.*, 2011).

En los compuestos fitoquímicos que produce el chile se encuentran pigmentos, capsaicinoides y vitaminas A, B y C. Los pigmentos se dividen en tres clases: clorofila, antocianinas y carotenoides (Guzmán *et al.*, 2011). Éstos últimos proporcionan un alto nivel nutricional y color al fruto, además de que también tienen un efecto de remoción de radicales libres (Gomez-Garcia y Ochoa-Alejo, 2013).

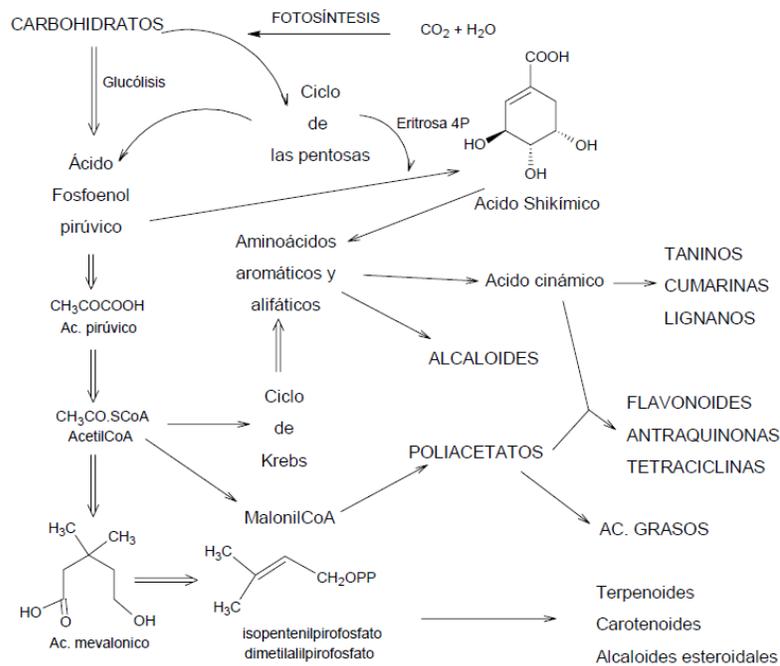


Figura 1.1. Rutas generales del metabolismo secundario (Dewick, 2002).

En cuanto a los capsaicinoides, éstos son alcaloides que proporcionan a los chiles la característica de pungencia (Aza-González *et al.*, 2011), y algunos estudios mencionan que presentan propiedades antitumorales e incluso curativas en diferentes tipos de cáncer (Pramanik y Srivastava, 2013).

Por otro lado, los flavonoides son compuestos fenólicos con propiedades nutraceuticas para el consumo humano, a nivel de planta su función es como atrayente y participa directamente en la coloración de flores y frutos principalmente (Hevert-Hernández *et al.*, 2010; Vera-Guzmán *et al.*, 2011).

Existen diversos estudios enfocados al conocimiento de compuestos bioquímicos en diferentes tipos de chile, desde los que abarcan evaluaciones fitoquímicas en general (Marín *et al.*, 2004; Vera-Guzmán *et al.*, 2011), hasta el análisis particular de algún compuesto como el contenido de carotenoides y color (Méndez-Trujillo *et al.*, 2005), la caracterización de antioxidantes (Hevert-Hernández *et al.*, 2010) y la determinación de capsaicinoides (Al Othman *et al.*, 2011), entre otros.

1.2.5. Capsaicinoides

Los capsaicinoides son compuestos que pertenecen al grupo de los alcaloides, formados por amidas ácidas de la vanillilamina y ácidos grasos de cadena ramificada de 9 a 11 carbonos, formados a partir de fenilalanina y valina (Collins *et al.*, 1995; Zewdie y Bosland, 2000), se produce sólo en las plantas del género *Capsicum* spp. Y su función es la de protección contra patógenos y herbívoros (Aza-González, 2011). Los dos capsaicinoides más abundantes en Chile son capsaicina (8-methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide) y dihidrocapsaicina, constituyendo aproximadamente el 90% del total de los capsaicinoides (Giuffrida *et al.*, 2013). Estos

capsaicinoides son secretados extracelularmente dentro de receptáculos entre la cutícula y la epidermis de la placenta en estructuras llamadas “blisters” (Stewart *et al.*, 2007). Estos receptáculos son macroscópicamente visibles y aparecen como gotas encima de la placenta del chile (Guzmán *et al.*, 2011). El contenido de capsaicina es un parámetro importante que determina la calidad comercial de un chile (Al Othman *et al.*, 2011). Por lo tanto el manejo genético ha incrementado el contenido de capsaicinoides en diferentes tipos de chile, buscando especies o variedades ricas en este alcaloide (Sathiyamurthy *et al.*, 2002).

1.2.5.1. Biosíntesis de capsaicinoides

En el metabolismo primario se producen los precursores para la síntesis de capsaicinoides (Figura 1.1) derivados de los aminoácidos fenilalanina y valina o leucina, respectivamente (Aza-González *et al.*, 2011). Los capsaicinoides son sintetizados a partir de dos vías: la del fenilpropanol y la vía de ácidos grasos de cadena ramificada (Figura 1.2.).

La primera prueba desarrollada para medir la pungencia fue la prueba de Scoville, desarrollada por Wilbur Scoville en 1912 (Scoville, 1912) y fue un método organoléptico. Con la escala Scoville de Picor se definieron cinco niveles para clasificar la pungencia de los chiles: no-pungente (0–700 SHU), medianamente pungente (700–3 000 SHU), moderadamente pungente (3 000–25 000 SHU), altamente pungente (25 000–70 000 SHU) y extremadamente pungente (>80 000 SHU) (Weiss, 2002).

Actualmente, para el análisis de la cuantificación de capsaicinoides en forma individual se utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que es un método aceptado y que brinda una cuantificación precisa (Collins *et al.*, 1995).

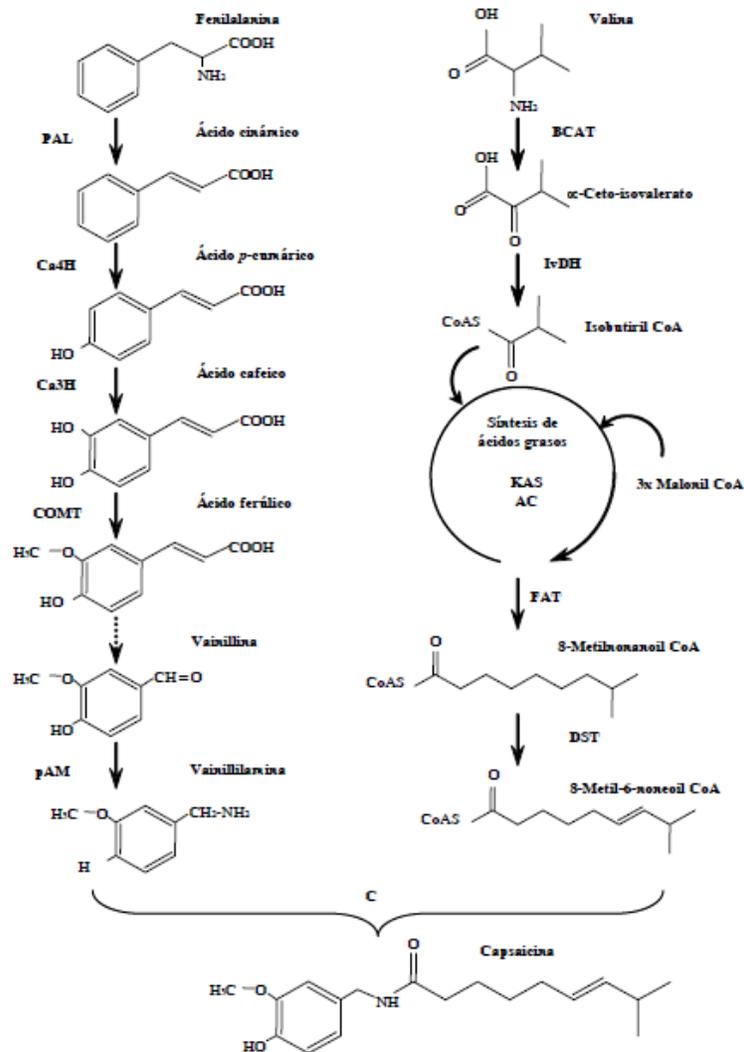


Figura 1.2. Biosíntesis de capsaicina (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

1.2.6. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos que tienen función a nivel de organelos y celular, brindando protección contra el daño oxidativo y como atrayentes para los polinizadores y agentes de dispersión de semillas (Schemske y Bradshaw, 1999; Sandmann, 2001). La propiedad de absorber luz se deriva de la presencia de siete o más enlaces dobles conjugados con posibilidad de absorber luz visible; su coloración va del amarillo al rojo (Sun-Hwa *et al.*, 2007).

Hay dos clases de carotenoides, a) los compuestos por carbono e hidrogeno y b) las xantofilas, compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno (Guzmán *et al.*, 2011).

En frutos maduros de chile, el metabolismo de carotenoides y su acumulación en los cromoplastos del pericarpio dan como resultado los colores amarillo, naranja y rojo (DellaPenna y Pogson, 2006). Los carotenoides que se presentan en mayor cantidad son los ceto-carotenoides a los que corresponden la capsantina y capsorrubina, que son sintetizados durante la maduración del fruto, contribuyendo a la coloración roja del mismo, mientras que beta-caroteno, zeaxantina, luteína y betacriptoxantina son responsables del color amarillo-naranja (Reeves *et al.*, 2013).

1.2.6.1. Biosíntesis de carotenoides

Los carotenoides pertenecen al grupo de los tetraterpenos; el precursor de éstos es el isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 1.3). La biosíntesis de carotenoides inicia con la vía del mevalonato, que a partir de acetil coenzima A produce IPP, que en muchos casos se isomeriza a dimetialil pirofosfato (DMAPP), al cual se le adicionan tres moléculas más de IPP para formar geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), reacción catalizada por la enzima GGPP sintasa; a partir de GGPP son diversas las rutas mediante las que se forman carotenoides y xantofilas (Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2013).

Una particularidad de los carotenoides es que son estables cuando se encuentran en los tejidos de la planta (intactos), pero al ser extraídos y aislados son vulnerables a los efectos de la temperatura, la luz y el oxígeno (Klieber y Bagnato, 1999).

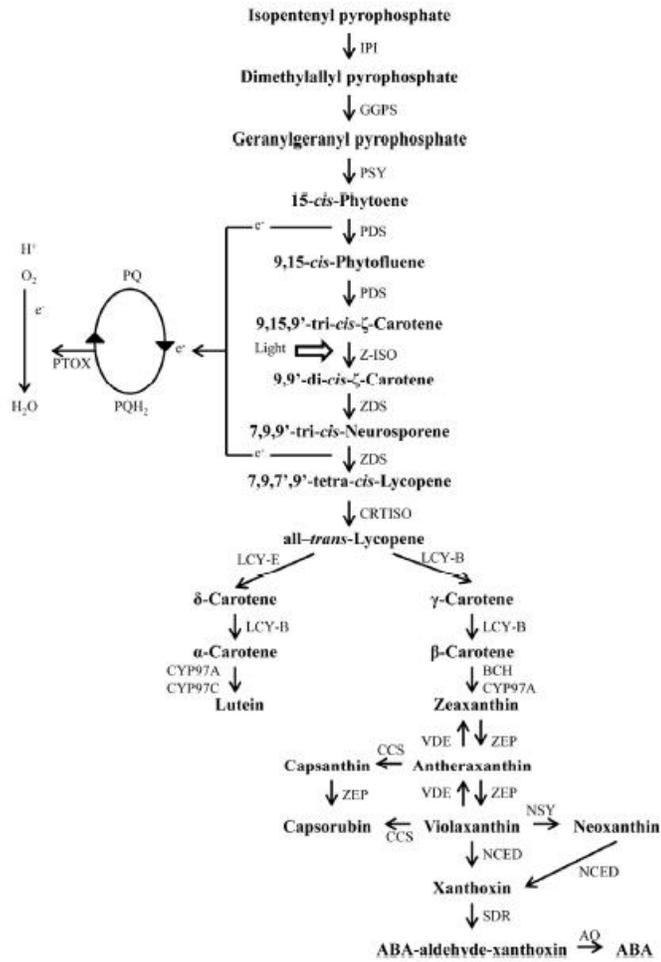


Figura 1.3. Biosíntesis de carotenoides (Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2013).

1.2.7. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales, formados por compuestos fenólicos, presentes en vegetales, y constituyen la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas (Escamilla *et al.*, 2009); estos pigmentos tienen la capacidad de proteger contra el daño oxidativo, como los rayos ultravioleta, contaminación y sustancias químicas (Aherne y O'Brien, 2002).

La diversidad en formas y funciones que presentan los flavonoides han permitido tener una base importante para su investigación en áreas de genética, bioquímica, evolución de la salud humana y nutrición (Grotewold, 2006). En el campo de la nutrición se considera que el mayor ingrediente nutracéutico en las plantas son los flavonoides, término que se refiere a cualquier alimento que provee beneficios a la salud, incluyendo la prevención y tratamiento de algunas enfermedades (Lin y Weng, 2006). La quercetina y la luteolina son los principales flavonoides presentes en Chile (Howard *et al.*, 2000).

1.2.7.1. Biosíntesis de flavonoides

En cuanto a la estructura química de los flavonoides, éstos son compuestos de bajo peso molecular con un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Bors *et al.*, 1990). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales, los flavonoides se pueden clasificar en flavanos (como la catequina), flavonoles (quercitina), flavonas (diosmetina) y antocianidinas (Letan, 1966).

La síntesis de flavonoides comienza con la ruta del ácido shikímico donde se incorpora una molécula de PEP para formar la fenilalanina, posteriormente con la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, después se incorpora un grupo hidroxilo para formar ácido p-cumarínico, y mediante la enzima CoA ligasa se transforma en cumaril-SCoA que da origen a los diferentes tipos de flavonoides presentes en plantas (Figura 1.4) (Grotewold, 2006).

Los flavonoides se pueden clasificar de acuerdo a su origen biosintético. Algunos son intermediarios de la ruta biosintética (chalconas, flavononas y flavanon-3-oles y flavan-3,4-dioles) o productos finales de la misma (antocianinas, flavonas, flavonoles, proantocianidinas) y otros son isoflavonoides (Giovannoni, 2004).

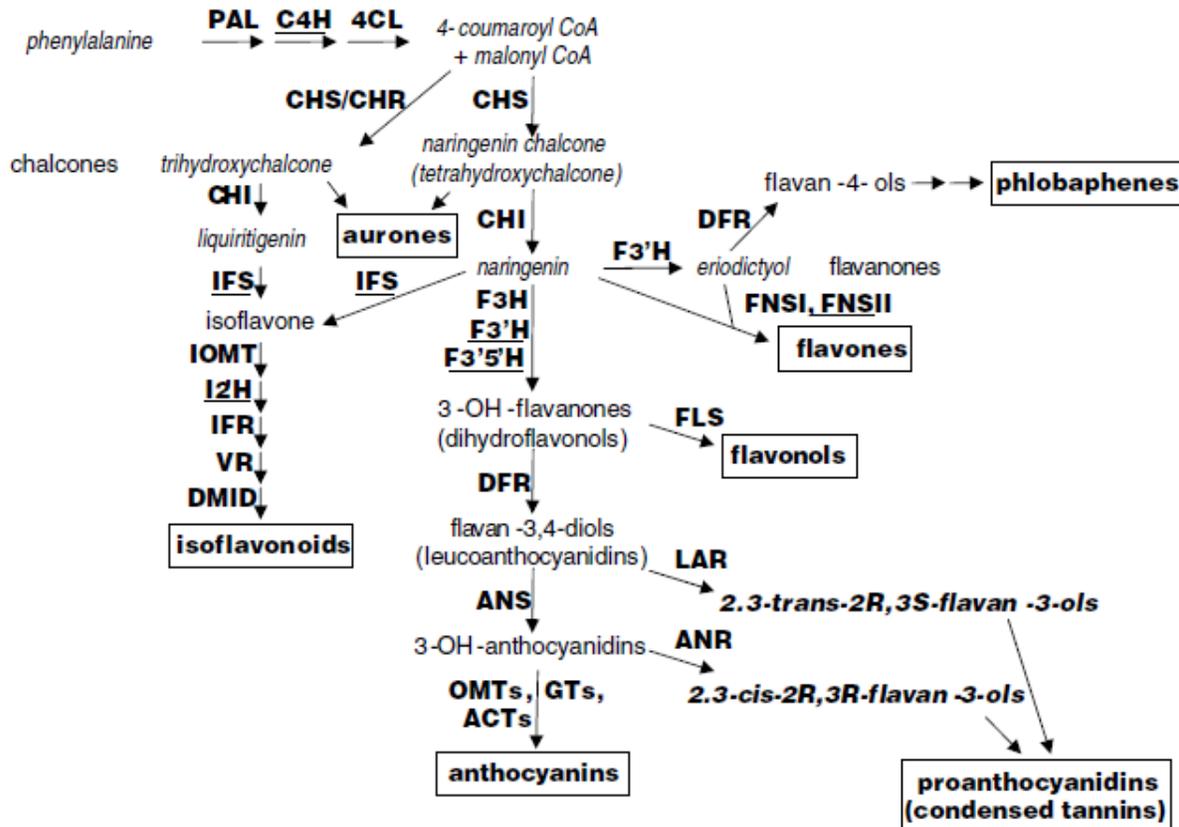


Figura 1.4. Biosíntesis de flavonoides (Grotewold, 2006).

Los métodos más comunes de cuantificación de flavonoides pueden ser colorimétricos o espectrofotométricos, aunque la cromatografía de líquidos de alta resolución hace posible una estimación rápida y precisa de todos los flavonoides presentes en una muestra, por lo que es

utilizada ampliamente para su cuantificación, además de métodos como la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (Stalikas, 2007).

1.2.8. Medición del color mediante colorimetría triestímulo

Para el caso particular del color de un fruto de chile hay que mencionar que éste es un atributo de calidad, tanto para los que se consumen en fresco o seco, como para las variedades que se destinan para la obtención de colorantes naturales y oleorresinas (Gómez-Ladrón de Guevara *et al.*, 1996), ya que en la industria alimenticia se buscan variedades con altos contenidos de carotenoides, compuestos relacionados con el color.

La determinación del color es una interpretación subjetiva, por lo tanto es difícil comunicar objetivamente un color específico; es por esto que se utilizan instrumentos de medición para distinguir un color de todos los demás, asignándole un valor numérico. Los instrumentos más utilizados son los espectrofotómetros, aunque también están los colorímetros, instrumentos triestimulares que asemejan su respuesta a la del ojo humano en cuanto a la percepción del color y la luz (XRite, 2002).

La CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) en 1931 estandarizó las fuentes de luz, observador y metodología para encontrar los valores para la descripción del color. Los sistemas CIE usan tres coordenadas para ubicar el color: a) CIE XYZ, b) CIE L*a*b* y c) CIE L*C*h°. Estas escalas se basan en la teoría de los colores opuestos. La escala CIELCH derivada de CIELAB emplea coordenadas polares en lugar de coordenadas cartesianas, haciendo más sencilla su interpretación (XRite, 2002).

La coordenada L expresa el grado de luminosidad del color medido en una escala de 0 (negro) a 100 (blanco); la coordenada “a” expresa el grado de rojo y verde (“a” negativa = más verde;

“a” positiva = más rojo) y la coordenada “b” expresa el grado de azul y amarillo (“b” negativa = más azul; “b” positiva = más amarillo) (Valero y Ruiz, 1998).

1.2.9. Análisis molecular

1.2.9.1. Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una secuencia de DNA situada en alguna posición específica del genoma, y su presencia permite identificar un gen de interés (Xu, 2010). Los marcadores moleculares se han convertido en herramientas importantes para hacer selección en el mejoramiento genético, en la diversificación de genotipos y en estudios de evolución y organización de los genomas vegetales (Dettori *et al.*, 2001).

La utilización de un marcador molecular puede realizarse en cualquier etapa del individuo, ya que éstos no se ven influenciados por el ambiente, permiten una detección temprana, son universales y utilizan poca cantidad de DNA para realizar el análisis; sin embargo tienen un costo elevado, se necesita de personal calificado, equipo sofisticado y un nivel elevado de control para evitar la contaminación (Agarwal *et al.*, 2008). Entre las aplicaciones de los marcadores moleculares se encuentran análisis filogenéticos y sistemáticos, estudios de biología de conservación, ecología molecular y la biología del desarrollo, así como pruebas de enfermedad y paternidad (Poczai *et al.*, 2013).

Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de DNA.

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción, por lo

que se ven menos influidos por el ambiente. La identificación de las isoenzimas es mediante “electroforesis”. La técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva; las isoenzimas han sido sustituidas por los marcadores de DNA.

Por otro lado, los marcadores de DNA se pueden agrupar en tres categorías: las de hibridación tipo Southern, las de reacción en cadena de polimerización (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de DNA con la hibridación tipo Southern.

La hibridación consiste en la formación de una molécula de doble cadena mediante el apareamiento o unión de bases complementarias de dos moléculas de una sola cadena, y explora las variaciones en la longitud o tamaño de los fragmentos de DNA ocasionadas por endonucleasas. Mediante esta técnica se realizan los RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable) (Sehgal y Raina, 2008; Varshney *et al.*, 2007).

Los marcadores de DNA que utilizan la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), amplifican fragmentos de DNA a partir de secuencias de nucleótidos denominadas “cebador” (primer), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual es complementaria. Dentro de esta metodología se encuentran los RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar), SSR (microsatélites), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del DNA), entre otros (Kalia *et al.*, 2011). Dentro de las metodologías que combinan la PCR o sus productos de DNA más la hibridación tipo Southern, están los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites) (Rajwant *et al.*, 2011).

1.2.9.2. Microsatélites

Los microsatélites conocidos como SSRs (simple sequence repeats), STRs (short tandem repeats) o STMS (sequence-tagged microsatellite sites) son repeticiones en tándem con secuencias motivo que pueden ser mono, di, tri, tetra o penta unidades de nucleótidos (Alvarez, 2011). Son marcadores genéticos muy utilizados ya que son codominantes, abundantes en el genoma, polimórficos, y su método es altamente reproducible (Agarwal *et al.*, 2008).

Diversos estudios en los que han utilizado marcadores moleculares, particularmente microsatélites, han servido para la conservación, utilización y conocimiento de los recursos de Chile (Rana *et al.*, 2014), en estudios evolutivos (Paran y van der Knaap, 2007), de diversidad genética (Contreras *et al.*, 2011; De Teodoro-Pardo *et al.*, 2007; Ved *et al.*, 2013) y de caracterización molecular (Lee *et al.*, 2004) por mencionar solo algunos.

Los microsatélites pueden ser usados eficazmente para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones y razas, de gran utilidad en la evaluación global de la diversidad (dentro y entre poblaciones), y utilizar la información generada para tomar decisiones en programas de conservación y mejoramiento animal y vegetal (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

1.3. REFERENCIAS

Agarwal M, N Shrivastava y H Padh (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27:617-631.

Aguilar-Meléndez A, P L Morrell, M L Roose y Seung-Chul K (2009) Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany* 96:1190-1202.

Aguilar-Rincón V H, T Corona T, P López L, L Latournerie M, M Ramírez M, H Villalón M y J A Aguilar C (2010) Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.

- Aherne S A y N M O'Brien (2002)** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18:75-81.
- Al Othman Z A, Y B H Ahmed, M A Habila y A A Ghafar (2011)** Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules* 16:8919-8929.
- Alvarez G M (2011)** La selección asistida por marcadores (MAS, Marker-assisted selection) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales* 32:154-171.
- Aranguren-Méndez J, R Román-Bravo, W Isea, Y Villasmil y J Jordana (2005)** Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos latinoamericanos de producción animal* 13(1):30-42.
- Aza-González C, H G Núñez-Palenius y N Ochoa-Alejo (2011)** Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Rep* 30:695-706.
- Bajaj Y (1988)** Biotechnology in agriculture and forestry 6. Crops II. Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg. 189-191 p.
- Barboza G E (2011)** Lectotypifications, synonymy, and a new name in *Capsicum* (Solanoideae, Solanaceae). *PhytoKeys* 2:23-38.
- Barceloux D G (2009)** Pepper and capsaicin (*Capsicum* and Piper Species). *Disease a month* 55:380-390.
- Bennett J W (1995)** From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. *Canadian Journal of Botany* 73(S1): 917-924, 10.1139/b95-339.
- Bors W, W Heller, C Michel y M Saran (1990)** Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology* 186:343.
- Bosland P W (1994)** Chiles: history, cultivation, and uses. *In: Spices, herbs, and edible fungi.* G Charalambous (ed). Elsevier Publ., New York., pp: 347-366.
- Brown A H D (1989)** The case for core collections. *In: The use of plant genetic resources.* A H D Brown, O H Frankel, D R Marshall and J T Williams (eds). Cambridge University Press Cambridge, Reino Unido, pp: 136-156.
- Collins M D, L M Wasmund y P W Bosland (1995)** Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using High-performance Liquid Chromatography. *HortScience* 30:137-139.

- CONABIO** (2014) Biodiversidad mexicana. <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/divgenetica.html>. Consultado en octubre de 2014.
- Contreras T A R , H López S, A Santacruz V, E Valadez M, V H Aguilar-Rincón, T Corona T y López P A (2011)** Diversidad genética en México de variedades nativas de Chile poblano mediante microsatélites. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34(4):225-232.
- De Teodoro-Pardo C V, A García-Velázquez y T Corona T (2007)** Polimorfismo cromosómico en *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) en recolectas de Puebla, Morelos y Querétaro, México. *Agrociencia* 41:873-881.
- DellaPenna D y B J Pogson (2006)** Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57:711-738.
- Dettori M T, R Quarta e I Verde (2001)** A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. *Genome* 44:783-790.
- Dewick P M (2002)** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons. 487 p.
- Escamilla J C I, E Y Cuevas M y J Guevara F (2009)** Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de México* Vol. 52 (2).
- FAOSTAT (2015)** Datos de producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Dirección de Estadística. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consultado en enero de 2015.
- Frankel O H (1984)** Genetic perspectives of germplasm conservation. *In: Genetic manipulation: impact on man and society*. W Arber, K Illmensee, W J Peacock and P Starlinger (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp: 161-170.
- Giovannoni J J (2004)** Genetic Regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16:S170-S180.
- Giuffrida D, P Dugo, G Torre, C Bignardi, A Cavazza, C Corradini y G Dugo (2013)** Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* 140:794-802.
- Gómez-García M R y N Ochoa-Alejo (2013)** Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecules Science* 14:19025-19053.
- Gómez-Ladrón de Guevara R, J E Pardo-González, R Varón-Castellanos y F Navarro-Albaladejo (1996)** Evolution of color during the ripening of selected varieties of paprika

- pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:2049-2052.
- Grotewold E (2006)** The science of flavonoids. Springer Science Business Media, Inc. 273 p.
- Guzmán I, P W Bosland y M A O'Connell (2011)** Heat, color, and flavor compounds in *Capsicum* fruit. In: The biological activity of phytochemicals, recent advances in phytochemistry 41. D R Gang (ed). Springer Science Business Media, Inc., New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp: 109-126.
- Hernández-Verdugo S, R G L España, P S Peña, M V Romero, S P Terraza, F Porras y J L C Madrid (2008)** Variación fenotípica entre y dentro de poblaciones silvestres de Chile del noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:323-330.
- Hevert-Hernández D, S G Sayago-Ayerdi e I Goñi (2010)** Bioactive Compounds of Four Hot Pepper Varieties (*Capsicum annuum* L.), Antioxidant Capacity, and Intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:3399-3406.
- Howard L R, S T Talcott, C H Brenes y B Villalon (2000)** Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1713-1720.
- IPGRI (1995)** Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Lee J M, S H Nahm, Y M Kim y B D Kim (2004)** Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108:619-627.
- Letan A (1966)** The Relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives I. primary activity. *Journal of Food Science* 31:518-523.
- Lin J y Meng-Shih W (2006)** Flavonoids as nutraceuticals. In: The Science of flavonoids. Springer, pp: 213-238.
- Loaiza-Figueroa F, K Ritland, J A L Cancino y S Tanksley (1989)** Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 165:159-188.
- Marín A, F Ferreres, F A Tomás-Barberán y M I Gil (2004)** Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:3861-3869.
- McLeod M J, S I Guttman, W H Eshbaugh y R E Rayle (1983)** An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution*:562-574.
- McLeod M, S I Guttman y W H Eshbaugh (1982)** Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Economic Botany* 36:361-368.

- Méndez-Trujillo V, D González-Mendoza y F A Gutiérrez-Miceli (2005)** Contenido de carotenoides y color extractable de nuevos cultivares en chile pimiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:215-218.
- Morán-Bañuelos S H, V H Aguilar-Rincón, T Corona T, F Castillo-González, R M Soto-Hernández y R San Miguel-Chávez (2008)** Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia* 42:807-816.
- Moreno-Pérez E d C, C H Avendaño-Arrazate, R Mora-Aguilar, J Cadena-Iñiguez, V H Aguilar-Rincón y J F Aguirre-Medina (2011)** Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (*Capsicum annuum* L.) del Centro-Norte de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17:23-30.
- Moscone E A, M A Scaldaferrro, M Grabile, N M Cecchini, Y Sánchez García, R Jarret, J R Daviña, D A Ducasse, G E Barboza y F Ehrendorfer (2006)** The evolution of chili peppers (*Capsicum*-Solanaceae): A cytogenetic perspective. *In: VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity* 745. pp: 137-170.
- Paran I y E van der Knaap (2007)** Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* 58:3841-3852.
- Pickersgill B (1997)** Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96:129-133.
- Piñero D, J Caballero-Mellado, D Cabrera-Toledo, C E Canteros, A Casas, S A Castañeda, A Castillo, R Cerritos, O Chassin-Noria, P Colunga-GarcíaMarín, P Delgado, P Díaz-Jaimes, L E Eguiarte, A E Escalante, B Espinoza, A Fleury, R S Flores, G Fragoso, J González-Astorga, V V Islas, E Martínez, F Martínez, J Martínez-Castillo, Y A Mastretta, R Medellín, L Medrano-González, F Molina-Freaner, V B Morales, V A Murguía, E Payró de la Cruz, M R Reyes-Montes, S M R Robles, G Rodríguez-Arellanes, B L Rojas, R Romero-Martínez, J H Sahaza-Cardona, S L R., E Sciutto, B C Scott, U Y Schramm, C Silva, V Souza, M L Taylor, R J Urbán, M Uribe-Alcocer, C M d J Vázquez, E Vázquez-Domínguez, P A Vovides, A Wegier, R A Zaldívar y G Zúñiga (2008)** La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *In: Capital natural de México. Conabio (ed) Vol I : Conocimiento actual de la biodiversidad. vol 15. México, México, pp: 437-494.*
- Poczai P, I Varga, M Laos, A Cseh, N Bell, J P Valkonen y J Hyvönen (2013)** Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9:6.
- Pozo C O , S Montes y E Redondo (1991)** Chile (*Capsicum* spp.). *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. R Ortega Paczka, G Palomino Hasbach, F Castillo González, V A González Hernández y M Livera Muñoz (eds). Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C., Mexico, pp: 217-238.*

- Pramanik C K and K S Srivastava (2013)** Role of Capsaicin in Cancer Prevention. *In: Diet and Cancer 3*. S K Srivastava (ed). Springer, pp: 1-14.
- Rajwant K K, R Manoj K, K Sanjay, S Rohtas, A K Dhawan (2011)** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334.
- Rana M, R Sharma, P Sharma, S V Bhardwaj y M Sharma (2014)** Estimation of Genetic Diversity in *Capsicum annuum* L. Germplasm Using PCR-Based Molecular Markers. *National Academy Science Letters* 37:295-301.
- Reeves G, A Monroy-Barbosa y P W Bosland (2013)** A Novel *Capsicum* gene inhibits host-specific disease resistance to *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 103:472-478.
- SAGARPA-SIAP (2015)** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Consultado en marzo de 2015.
- Sandmann G (2001)** Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of biochemistry and biophysics* 385:4-12.
- Schemske D W y H Bradshaw (1999)** Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:11910-11915.
- Scoville W L (1912)** Note on capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 1:453-454.
- Sehgal D y S N Raina (2008)** DNA markers and germplasm resource diagnostics: new perspectives in crop improvement and conservation strategies. *Utilization of Biotechnology in Plant Sciences*.
- Stalikas C D (2007)** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30:3268-3295.
- Stewart C, M Mazourek, G M Stellari, M O'Connell y M Jahn (2007)** Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany* 58:979-991.
- Sun-Hwa H, K Jung-Bong Kim, P Jong-Sug, L Shin-Woo y C Kang-Jin (2007)** A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58:3135-3144.
- Valero U C y A Ruiz M (1998)** Equipos de medida de calidad organoléptica en frutas. *Fruticultura Profesional* 95:38-45.

- van Hintum T J L, A H D Brown, C Spillane y T Hodgkin (2003)** Colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. *Boletín técnico del IPGRI* 3. 44 p.
- Varshney R K, T C Marcel, L Ramsay, J Russell, M S Röder, N Stein, R Waugh, P Langridge, R E Niks y A Graner (2007)** A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1091-1103.
- Vázquez-Flota F, M d L Miranda-Ham, M Monforte-González, G Gutiérrez-Carbajal, C Velázquez-García y Y Nieto-Pelayo (2007)** La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37:353-360.
- Ved P R, K Rajesh, K Sanjay, R Ashutosh, K Sanjeet, S Major, S Pratap S, A Bahadur R y P Rajneesh (2013)** Genetic diversity in *Capsicum* germplasm based on microsatellite and random amplified microsatellite polymorphism markers. *Physiology Molecular Biology of Plants* 19:575-586.
- Vera-Guzmán A M, J L Chávez-Servia, J C Carrillo-Rodríguez y M G López (2011)** Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, México. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71:578-585.
- Wahyuni Y, A R Ballester, E Sudarmonowati, R J Bino y A G Bovy (2011)** Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72:1358-1370.
- Weiss E A (2002)** Spice crops. CAB International publishing. London, UK. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn. 399 p.
- XRite (2002)** Guía para entender la comunicación del color. 24 p.
- Xu Y (2010)** Molecular plant breeding. CAB International publishing. London UK. 734 p.
- Zewdie Y y P W Bosland (2000)** Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 111:185-190.

CAPÍTULO II

CAPSAICINOIDES, CAROTENOIDES, FLAVONOIDES Y COLOR EN FRUTO SECO DE LAS COLECTAS CENTRALES DE CHILE GUAJILLO Y PASILLA

CAPSAICINOIDS, CAROTENOIDS, FLAVONOIDS AND FRUIT COLOR OF CHILE GUAJILLO AND PASILLA CORE COLLECTION

**Verónica Trujillo-Pahua¹, Tarsicio Corona-Torres^{1*}, Víctor Heber Aguilar-Rincón¹,
Higinio López-Sánchez²**

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco C.P. 56230, Estado de México, México.

²Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205, Santiago Momoxpan, Municipio de San Pedro Cholula. C.P. 72760, Puebla, México.

**Autor para correspondencia (tcoronat@colpos.mx)*

RESUMEN

En México, la diversidad de *Capsicum annuum* L. es amplia, y tiene gran importancia por aportar sabor, picor y olor a los platillos. Aunque se han realizado estudios de caracterización en varios tipos de chile, la información es insuficiente en cuanto al contenido de capsaicinoides, flavonoides, y el color de fruto maduro. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el contenido de capsaicinoides, carotenoides, flavonoides y el color en fruto seco de las colectas centrales de chile guajillo y pasilla, incluyendo además cinco poblaciones de chile puya. La cuantificación de capsaicinoides fue mediante HPLC, y el resto de las variables con espectrofotometría. Se utilizaron frutos de dos ensayos establecidos en las localidades de Calera, Zacatecas y Villa de Arista, San Luis Potosí. Hubo variación entre y dentro de tipos de chile para las diferentes variables. La mayor acumulación de capsaicinoides fue en chile puya (25 849 SHU); para carotenos y flavonoides fue en chile pasilla (124 mg por 100g MS y 6.4 mg por 100 g MS, respectivamente). Las colectas con mayor acumulación de capsaicinoides en chile guajillo fueron SLP103, CP-1128, SLP-1012 y CP-1226; para pasilla CP-1224, CP-1239 y CP-951; y para puya CP-1138, CP-1169, CP-1211 y CP-1127. En cuanto a carotenoides dentro de chiles pasilla y puya destacaron las colectas CP-1113 y CP-1138, respectivamente. En cuanto al efecto de localidad, la mayor producción de capsaicinoides y carotenoides fue en San Luis Potosí, y la de flavonoides en Zacatecas. El chile pasilla presentó un color rojo oscuro, el guajillo y puya un rojo claro brillante. Los genotipos tuvieron una interacción significativa con el ambiente. La cantidad de capsaicinoides, carotenoides y flavonoides fue mayor a lo mencionado en otros trabajos para estos tipos de chile, lo que indica diversidad que puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, capsaicinoides, carotenoides, color, diversidad, flavonoides.

SUMMARY

In México there is a wide diversity for *Capsicum annum* L., and this species is important for giving taste, spicy flavor and aroma to the Mexican cuisine. Although characterization studies have been carried out in several types of chile, there is not enough information regarding capsaicinoids, carotenoids and flavonoids content, and color in mature fruit. Because of the aforementioned, the objective of this study was to determine capsaicinoids, carotenoids, and total flavonoids content, and dried fruit color in core collections of chile guajillo and pasilla, and in five accessions of chile puya. Capsaicinoids content was quantified using HPLC, while the other parameters were quantified by spectrophotometry. Fruits from two assays, cultivated in Calera, Zacatecas and Villa de Arista, San Luis Potosí, Mexico, were analyzed. There was variation among and within types of chile for all the parameters studied. The highest capsaicinoids content was found in chile puya (25 849 SHU), while the highest content of carotenoids and flavonoids was found in chile pasilla (124 mg per 100 g DM y 6.4 mg per 100 g DM, respectively). Accessions with the highest capsaicinoids content in chile guajillo were SLP103, CP-1128, SLP-1012 y CP-1226; in pasilla they were CP-1224, CP-1239 y CP-951; and for puya they were CP-1138, CP-1169, CP-1211 y CP-1127. As for carotenoids in chile pasilla and puya, two accessions stood out: CP-1113 y CP-1138, respectively. It was also found that capsaicinoids and carotenoids content was higher in San Luis Potosí than in Zacatecas, while for flavonoids, it was the opposite. Chile pasilla had a dark red color, and chile guajillo and puya had a bright light red color. Accessions had a significant interaction with the environment. The capsaicinoids and carotenoids content found in this study was greater than that of previous reports for this type of chiles, indicating diversity that can be used in *Capsicum* breeding programs.

Keywords: *Capsicum annum*, diversity, capsaicinoids, carotenoids, flavonoids, color.

2.1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia a nivel mundial, tanto por la superficie cultivada como por el valor económico de la producción (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). En México la producción de chile seco en 2012 fue de 60,000 toneladas (FAOSTAT, 2015), presentación utilizada generalmente como condimento, ya que es ingrediente principal de la gastronomía mexicana, y aporta picor, color y sabor a los platillos (Barceloux, 2009).

El principal atributo del chile como condimento es el picor, dado principalmente por capsaicina y dihidrocapsaicina, alcaloides que aportan cerca del 90% de los capsaicinoides totales en el fruto (Giuffrida *et al.*, 2013). Otra de las características importantes en el fruto del chile es el color, distintivo que determina parte de su calidad. Dos de las sustancias relacionadas con el color son flavonoides y carotenoides, que en chile son una fuente de antioxidantes benéficos para la salud (Guzmán *et al.*, 2011).

Dentro de la diversidad de chiles, los más importantes por su consumo son los tipo jalapeño, ancho, guajillo, pasilla, serrano, de árbol y piquín (Laborde-Cancino y Pozo-Campodónico, 1982; Pozo *et al.*, 1991). Aunque se han realizado varios estudios de diversidad en chile mediante caracterizaciones de tipo morfológico, bioquímico y molecular (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2011; Morán-Bañuelos *et al.*, 2008; Moreno-Pérez *et al.*, 2011), la información generada no ha sido suficiente debido a la amplia diversidad de chiles en México (Bellon *et al.*, 2009; Piñero *et al.*, 2008) y sólo algunos de ellos han sido caracterizados. De estos estudios, la determinación de compuestos fitoquímicos presentes y su cantidad tiene especial importancia en la calidad del chile y en su valor nutracéutico (Long, 2009).

Los estudios bioquímicos realizados en diferentes tipos de chile (Collera-Zúñiga *et al.*, 2005; De Masi *et al.*, 2007; Hevert-Hernández *et al.*, 2010; Vera-Guzmán *et al.*, 2011; Zhang y Hamauzu, 2003) han analizado una sola población por tipo de chile en la mayoría de los casos, y estos pueden no ser los más representativos de su tipo, por lo que es importante cubrir este conocimiento con la caracterización de un número más grande de poblaciones que contengan mayor diversidad dentro de un tipo de chile.

Derivado de estudios previos sobre caracterización morfológica en chile guajillo y pasilla se estableció una colección central de cada uno de ellos, compuestas de 15 y 11 poblaciones, respectivamente. Para ampliar la información de estos tipos de chile se planteó como objetivo determinar el contenido de capsaicinoides, carotenoides, flavonoides y color en frutos secos de la colección central de chile guajillo y pasilla. Con lo anterior se fortalecerá el conocimiento sobre la composición química de chile, ya que las colecciones centrales analizadas provienen de los estados de la República Mexicana con mayor producción y diversidad de chile guajillo y pasilla.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Derivado de un estudio previo sobre caracterización morfológica de 80 accesiones de chile guajillo y de 30 de chile pasilla se formaron dos colecciones centrales, compuestas de 15 y 11 accesiones, respectivamente. Ambas colecciones fueron consideradas en esta investigación, incluyendo además cinco accesiones de chile puya, debido a que éste es considerado una variante de chile guajillo (Santamaría *et al.*, 2000; Wall *et al.*, 2001) (Cuadro 2.1).

Las 31 poblaciones se sembraron en las localidades de Calera, Zacatecas y Villa de Arista, San Luis Potosí, en un diseño de bloques completamente al azar con dos repeticiones. La parcela

experimental consistió en dos surcos de 5 m de largo, 0.9 m entre surcos y 0.33 m entre plantas, cultivadas mediante fertirriego en ambas localidades.

Cuadro 2.1. Procedencia y georreferenciación de las accesiones utilizadas.

Tipo de chile	Población	Edo. ‡	Mpio.	Latitud†	Longitud†	Altitud (msnm)†
Guajillo	CP-1119	S.L.P.	Villa de Reyes	23°04'33.06"	102°09'07.15"	1989
	CP-1121	Zac.	Vetagrande	22°54'50.10"	102°25'39.8"	2099
	CP-1128	Zac.	Guadalupe	22°57'20.2"	102°24'5.6"	2061
	CP-1135	Zac.	Calera	22°55'54.82"	102°43'33.31"	2190
	CP-1143	Zac.	Calera	22°52'51.67"	102°43'14.42"	2195
	CP-1175	Zac.	Villa de Cos	23°04'14.66"	102°38'32.39"	2095
	CP-1226	Ags.	Cosío	22°22'42.7"	102°16'45.2"	1779
	SLP 101	S.L.P.	Moctezuma	22°47'29"	100°57'36"	1630
	SLP 102	S.L.P.	Moctezuma	22°47'29"	100°57'36"	1630
	SLP 103	S.L.P.	Moctezuma	22°48'06"	100°57'24"	1637
	SLP 106	S.L.P.	Moctezuma	22°45'04"	100°58'34"	1649
	SLP-1010	S.L.P.	Villa de Reyes	22°47'49"	102°5'40"	2047
	SLP-1012	S.L.P.	Villa de Reyes	22°47'52"	102°2'38"	2048
	SLP-1015	S.L.P.	Villa de Reyes	23°00'28"	102°11'20"	1987
	SLP-1020	S.L.P.	Villa de Reyes	23°06'56"	102°9'23"	1974
Pasilla	CP-951	Mich.	Queréndaro	19°48'51.01"	100°52'55.10"	1850
	CP-952	Mich.	Queréndaro	19°48'51.01"	100°52'55.10"	1850
	CP-955	Mich.	Queréndaro	19°48'21.56"	100°54'8.00"	1850
	CP-1113	Zac.	Vetagrande	22°54'0.09"	102°26'0.02"	2105
	CP-1176	Zac.	Villa de Cos	23°04'14.66"	102°38'32.39"	2095
	CP-1224	Ags.	Cosío	22°22'42.7"	102°16'45.2"	1779
	CP-1239	Gto.	San Felipe	21°07'55.4"	100°44'28.9"	1885
	CP-1242	Gto.	San Felipe	21°43'19.4"	101°01'41.7"	1862
	CP-1295	Jal.	Ojuelos	21°54'46.5"	101°40'0.9"	2147
	CP-1297	S.L.P.	Villa de Reyes	21°53'7.5"	100°53'12.6"	1805
Puya	CP-1298	S.L.P.	Villa de Reyes	21°47'42.4"	100°58'50.3"	1835
	CP-1122	Zac.	Vetagrande	22°54'50.1"	102°25'39.8"	2099
	CP-1127	Zac.	Pánuco	20°02'59.6"	102°26'2.4"	2037
	CP-1138	Zac.	Calera	22°55'22.42"	102°44'48.75"	2213
	CP-1169	Zac.	Villa de Reyes	23°04'14.66"	102°38'32.39"	2095
	CP-1211	Zac.	Ojo Caliente	23°31'54.82"	102°08'03.07"	2075

† Georreferenciación en el lugar de la colecta. ‡ Edo.: Estado; Zac.: Zacatecas; S.L.P.: San Luis Potosí; Jal.: Jalisco; Gto.: Guanajuato; Ags.: Aguascalientes; Mich.: Michoacán.

De cada parcela experimental se seleccionaron seis plantas al azar, de las cuales se tomaron dos frutos maduros (color rojo) del estrato medio de la planta. Los 12 frutos de cada parcela se secaron en una estufa Blue M Electric Company (Blue Island, Illinois) durante cinco días a 40

°C. Las muestras de cada población se molieron sin semilla en un molino marca Krups modelo GX410011 y se mantuvieron en un lugar fresco, seco y en ausencia de luz hasta su uso.

2.2.1. Extracción y cuantificación de capsaicoides

Para la extracción se pesó 0.5 g de chile en polvo por muestra, colocando cada una en un tubo tipo Falcon de 15 mL, agregándoles 5 mL de acetonitrilo grado HPLC. Los tubos se taparon y colocaron en baño María a 60 °C durante cinco horas, con agitación cada 30 min. Posteriormente las muestras se enfriaron y se conservaron a temperatura ambiente durante 12 h en ausencia de luz. Se filtraron 2 mL de sobrenadante con acrodiscos de celulosa (Millipore[®], 25 mm de diámetro, poro de 0.45 µm), que se conservaron en tubos eppendorf en refrigeración hasta su análisis.

Se cuantificaron únicamente capsaicina (CAP) y dihidrocapsaicina (DH), debido a que son los compuestos que aportan el mayor porcentaje de picor en el fruto (Giuffrida *et al.*, 2013). Esto se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Hewlett Packard[®] serie 1100 con detector UV-Visible, equipado con una columna C18 (150x4.6 mm D.I.; partículas de 5 µm). Se empleó el método 995.03 propuesto por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC International, 1998).

Antes del análisis de las muestras se construyeron dos curvas de calibración (R^2 0.99) con estándares externos de capsaicina (8-methyl-n-vanillyl-6-nonenamide) y dihidrocapsaicina (8-methyl-n-vanillyl-nonanamide) (Natural Capsaicin[®], Sigma). El tiempo de retención fue en 10.25 min para capsaicina y 15.35 min para dihidrocapsaicina. Una vez construida la curva de calibración se inyectaron 20 µL de cada muestra, con dos repeticiones. El tiempo de análisis fue

de 18 min. La fase móvil consistió de acetonitrilo: agua en una proporción de 45:55 (v/v) y un flujo isocrático de 1.5 mL min⁻¹ a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se leyó a 280 nm.

2.2.2. Extracción y cuantificación de carotenoides totales

Para la extracción se siguió el método de Nagata y Yamashita (1992), con la modificación de 1 a 0.5 g en el peso de muestra. Las muestras se colocaron en tubos tipo Falcon y se les agregaron 10 mL de acetona:hexano en proporción 4:6 (v/v), se agitaron durante 1 min, y se tomaron 200 µL del sobrenadante por duplicado, colocándose en una microplaca de 96 pozos, para leer su absorbancia a 453, 503, 645 y 663 nm en un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA). Los resultados se reportaron en mg por 100 g de materia seca (MS) de carotenoides totales.

2.2.3. Extracción y cuantificación de flavonoides totales

Se determinaron mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio propuesto por Chang *et al.* (2002), modificado por Meneses-Reyes *et al.* (2008) y por Palma Tenango (2014).

Se construyó una curva de calibración con quercetina, a concentraciones de 0, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 2, 3 y 4 µg mL⁻¹. La ecuación de regresión obtenida fue $y=0.0143x+0.049$ con $R^2=0.985$, donde x = lectura de absorbancia a 415 nm; y = concentración de la muestra expresada como µg mL⁻¹ de flavonoides totales.

Para la extracción de los flavonoides se pesaron 0.25 g de cada muestra y se colocaron en tubos de ensaye de fondo plano. Se agregaron 500 µL de metanol al 80% y se incubaron en baño María a 70 °C por una hora, centrifugándolos después a 731 x g durante 13 min en una

centrífuga EBA 21. Del sobrenadante se obtuvieron alícuotas de 150 μL , a las que se agregaron 37 μL de metanol al 80%; de la mezcla anterior se tomó una alícuota de 50 μL a la que se le adicionaron 100 μL de acetato de potasio y 100 μL de cloruro de aluminio, se aforó a 5 mL con metanol al 80%. Las muestras permanecieron 40 min en la oscuridad y se tomaron 200 μL por duplicado de cada muestra en una microplaca, la absorbancia de las muestras se leyeron a 415 nm en un espectrofotómetro (Multiskan FC Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA). Los resultados se reportaron en mg de flavonoides totales por 100 g de materia seca (MS).

2.2.4. Determinación del color

Se midió el color del pericarpio de cuatro chiles por colecta, mediante un espectrofotómetro MiniScan EZ 4500L marca HunterLab (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) provisto con una fuente de iluminación D65, la cual incidió sobre la muestra a 45° y el observador a 0°. Los resultados en los ángulos L^* , a^* y b^* se transformaron mediante las fórmulas descritas por McGuire (1992) para obtener los parámetros L^* , C^* y h° que son luminosidad (L), croma (C) y tono (Hue, h°).

2.2.5. Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza mediante el modelo: $y = \mu + \tau + \beta + \theta(\tau) + \tau*\beta + \varepsilon$; donde: y = variable dependiente, μ =efecto de la media general, τ = tipos de chile, β = localidades, $\theta(\tau)$ = población dentro de tipo, $\tau*\beta$ = efecto de la interacción tipo de chile por localidad, y ε = error experimental. Se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Ambos análisis se realizaron mediante el paquete SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2014).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado del análisis de varianza mostró efectos significativos en los factores tipo de chile, localidad y colecta dentro de tipo. En el factor tipo de chile, las variables con un efecto significativo ($p \leq 0.0001$) fueron contenido de capsaicina, dihidrocapsaicina, capsaicinoides totales, carotenoides, flavonoides, croma, hue y luminosidad; la diferencia entre localidades se presentó en las variables capsaicina ($p \leq 0.0033$), capsaicinoides totales ($p \leq 0.0065$), carotenoides ($p \leq 0.0001$), flavonoides ($p \leq 0.0039$) y hue ($p \leq 0.0024$); y para el factor colecta dentro de tipo de chile, la diferencia significativa fue en capsaicina ($p \leq 0.0103$), dihidrocapsaicina ($p \leq 0.0002$), capsaicinoides totales ($p \leq 0.0001$), carotenoides ($p \leq 0.0101$), croma ($p \leq 0.0009$) y hue ($p \leq 0.0069$). Lo anterior muestra que el genotipo interactuó con los ambientes en donde se establecieron los experimentos.

La concentración de capsaicina, dihidrocapsaicina y capsaicinoides totales en chile puya superó significativamente a los tipo guajillo y pasilla (Cuadro 2.2); en promedio la acumulación de capsaicina fue mayor que la de dihidrocapsaicina en los tres tipos de chile, y la relación entre ambos compuestos fue de 1:0.58, respectivamente. Los valores descritos en este trabajo para capsaicinoides superan a los valores descritos por DeWitt y Bosland (2009) y a los que establece la Norma Mexicana NMX-FF-107/1-SCFI-2006. Lo anterior puede deberse a que la pungencia del chile es dada por el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina, y esta depende del genotipo (Gurung *et al.*, 2011) y de factores ambientales, principalmente temperatura alta y estrés hídrico (Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Al respecto, González-Zamora *et al.* (2013) reportan 61,526 SHU y 13,705 SHU en variedades mexicanas de chile puya y en la variedad San Luis de chile guajillo, respectivamente, contenidos altos de capsaicinoides como respuesta a las altas temperaturas,

aunque solo analizaron una población por tipo de chile. Las 31 colectas estudiadas en este trabajo fueron variedades nativas de origen diverso, factor por el cual se difiere de los estudios antes mencionados, además de que muchas de éstas colectas han permanecido más tiempo en sus lugares de origen y otras han sido intercambiadas por los agricultores, por lo anterior, el comportamiento de las colectas no es uniforme en ambas localidades. La pungencia registrada pudo verse ligeramente aumentada debido a que las determinaciones se realizaron utilizando solo pericarpio y placenta, similar a los estudios de Pino *et al.* (2007), Sanatombi y Sharma (2008) y Morán-Bañuelos *et al.* (2008), incrementando así el contenido de capsaicinoides por gramo de materia seca.

Las colectas dentro de tipo de chile que presentaron un mayor contenido de capsaicinoides totales fueron para guajillo: SLP103, CP-1128, SLP-1012 y CP-1226; pasilla: CP-1224, CP-1239 y CP-951; y puya: CP-1138, CP-1169, CP-1211 y CP-1127 (Cuadro 2.2). Las poblaciones anteriores pueden ser utilizadas en un programa de mejoramiento genético que busque obtener variedades con altos contenidos de capsaicinoides.

Considerando las dos localidades de evaluación, la cantidad de capsaicinoides en San Luis Potosí superó en 28.7% a lo registrado en las poblaciones de Zacatecas (Cuadro 2.2). Estos resultados se podrían explicar considerando las temperaturas promedio en 2013 presentadas en San Luis Potosí y Zacatecas (23.1°C y 17.6°C, respectivamente) (CONAGUA, 2015), de acuerdo con Gurung *et al.* (2011) las temperaturas altas influyen en el aumento de la producción de capsaicinoides, lo que coincide con los resultados de este trabajo.

Cuadro 2.2. Comparación de medias entre y dentro de tipos de chile y localidades para las variables analizadas.

Tipo/col/loc	Cap. † (SHU)	DH. †† (SHU)	Cap.Tot.¶ (SHU)	Croma	Hue (°)	L¶¶	Caro. (mg por 100 g MS) ^x	Flavo. (mg por 100 g MS) ^{xx}
Guajillo	6 783 B	4 162 B	10 890 B	10.4 B	27.6 B	22.4 B	92 B	5.05 B
SLP103	11 878 a	7 210 a	18 599 a	7.9 a	33.3 a	19.6 a	97 a	4.0 a
CP-1128	10 887 ab	4 823 cd	15 710 b	7.6 a	26.1 a	21.8 a	94 a	4.7 a
SLP1012	8 622 abc	7 225 a	14 478 bc	12.6 a	24 a	22.7 a	92 a	5.4 a
CP-1226	8 090 bcd	6 329 b	15 573 b	11.3 a	29.5 a	22.5 a	98 a	4.5 a
SLP1020	7 247 dc	5 591 bc	13 493 cd	8.3 a	30 a	23 a	95 a	4.7 a
SLP102	7 031 cde	4 886 bc	11 774 ed	12.2 a	28.6 a	21.8 a	95 a	4.1 a
SLP1015	6 671cde	2 648 e	10 227 ef	10.4 a	25.8 a	22.6 a	92 a	5.9 a
CP-1175	5 841 cde	2 860 e	8 357 fgh	10.6 a	26.2 a	22.6 a	98 a	3.7 a
SLP101	5 680 cde	2 870 e	8 550 efg	8.6 a	26 a	22.1 a	96 a	4.8 a
CP-1121	5 594 cde	1 358 f	6 952 hi	9.7 a	26.1 a	20.2 a	78 a	6.6 a
CP-1135	5 576 cde	4 515 d	10 091 ef	11.0 a	27.8 a	21.2 a	98 a	5.3 a
CP-1119	4 864 ed	4 557 cd	8 317 ghi	10.3 a	26.7 a	24.1 a	74 a	4.2 a
SLP106	4 725 ed	2 367 e	7 092 hi	8.4 a	27.3 a	21.4 a	87 a	4.7 a
CP-1143	4 674 e	2 201 e	6 776 hi	16 a	28.4 a	24.2 a	94 a	6.9 a
SLP1010	4 372 e	2 992 d	7 364 hi	11.7 a	28 a	25.4 a	78 a	6.2 a
DMS	3 389	801	1 767	10	15.1		43	4.8
Pasilla	5 921 B	3 640 B	9 508 B	3.6 C	45.7 A	20.4 B	124 A	6.4 A
CP-1224	10 583 a	5 991 a	16 573 a	4.8 ab	33.9 c	20.9 a	104 b	6.3 a
CP-1239	6 997 a	3 800 c	10 798 b	2 b	44.5 abc	20.3 a	130 ab	6.5 a
CP-951	6 654 bcd	3 919 c	10 572 b	9.3 a	35.5 bc	20.8 a	130 ab	6.4 a
CP-1113	6 250 bcd	3 902 c	10 152 cb	2 b	62.5 a	22.9 a	148 a	6.1 a
CP-1242	6 215 bcd	2 868 d	9 083 cde	2 b	44.6 abc	21.2 a	133 ab	5.9 a
CP-955	5 854 cde	2 806 d	8 657 ed	2.3 b	40.7 abc	17.4 a	120 ab	7.6 a
CP-1176	5 269 de	4 927 b	9 918 bcd	2.9 b	48.9 abc	21.3 a	135 ab	7.5 a
CP-952	4 833 ef	2 077 e	6 910 fg	3.1 b	43.9 abc	20.4 a	120 ab	5.1 a
CP-1298	4 692 ef	3 887 c	8 637 ed	4.5 ab	49.3 abc	20.2 a	119 ab	5.9 a
CP-1297	4 301 gf	3 638 c	7 765 ef	4.5 ab	38.8 abc	19.8 a	124 ab	5.9 a
CP-1295	3 480 g	2 229 e	5 525 g	2.3 b	60.4 ab	19.4 a	105 ab	6.8 a
DSM	903	547	1 392	5.9	25.1	9.1	44	3.79
Puya	17 287 A	8 574 A	25 849 A	17.3 A	31.6 B	28.1 A	100 B	4.4 B
CP-1138	22 446 a	10 831 a	33 277 a	21.7 a	25.3 a	28.6 a	143 a	5.2 a
CP-1169	20 499 ab	9 810 ab	30 308 ab	7.3 b	38 a	22 a	89 b	3.7 a
CP-1211	19 324 b	8 867 b	28 191 b	14.8 ab	27.8 a	28 a	84 b	4.5 a
CP-1127	18 291 b	10 339 ab	28 630 b	23 a	40.9 a	29.4 a	99 b	3.9 a
CP-1122	9 532 c	4 721 c	14 205 c	16.5 ab	29.1 a	29.8 a	88 b	4.5 a
DSM	3 115	1 486	4 615	2.9	2.9	2.9	286	4.28
San Luis Potosí	8 793 a	4 902 a	13 761 a	8.6 a	37.9 a	22.4 a	118 a	5.03 b
Zacatecas	6 732 b	4 129 a	10 691 b	8.9 a	31.9 b	22.3 a	91 b	5.89 a
DMS	838	743	1 497	1.3	3.2	1.2	6.5	0.61

Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). †Cap.: capsaicina; ††DH.: dihidrocapsaicina; ¶Cap.Tot: Capsaicinoides totales; ¶¶L: Luminosidad; ^xCaro.: Carotenoides; ^{xx}Flavo.: Flavonoides. SHU= Scoville Heat Units. $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de capsaicinoides = 15 SHU.; mg g^{-1} MS: miligramos por gramo de materia seca. Mayúsculas para comparar entre tipos de chile y minúsculas para comparar entre poblaciones dentro de un mismo tipo de chile.

La concentración de capsaicinoides de cada accesión en las dos localidades se puede observar en el Cuadro 2.3. Las poblaciones presentaron un comportamiento diferencial por localidad. En guajillo las colectas CP-1121, CP-1128, CP-1143, CP-1175, CP-1226, SLP-1012 y SLP-1020 presentaron un mayor contenido de capsaicina, dihidrocapsaicina y capsaicinoides totales en San Luis Potosí. Por otro lado, las colectas CP-1119, CP-1135 fueron las únicas que presentaron una mayor concentración de dihidrocapsaicina que de capsaicina en la localidad de Zacatecas; el mayor contenido de dihidrocapsaicina en comparación con la capsaicina se ha reportado para diferentes tipos de chile, incluidos el puya y el guajillo, lo que se atribuye al efecto de variedades regionales (factores genéticos) y condiciones ambientales (González-Zamora *et al.*, 2013).

En el caso de chile pasilla, las colectas CP-951, CP-952, CP-955, CP-1113, CP-1176, CP-1239, CP-1242 y CP-1297 presentaron un mayor contenido de capsaicinoides en San Luis Potosí, siendo esto último la tendencia general en las colectas de este tipo de chile. Todas las colectas presentaron mayor contenido de capsaicina que de dihidrocapsaicina.

Para chile puya la colecta CP-1122 registró el mayor contenido de capsaicinoides en San Luis Potosí, el resto de las poblaciones quedaron como valores indicativos para una sola localidad. En los resultados de puya puede existir un sesgo, debido a que hay muestras ausentes y los valores reportados se obtuvieron en la localidad con los mayores contenidos de capsaicinoides.

Con respecto a carotenoides, el chile pasilla fue estadísticamente superior a guajillo y puya, con una concentración de 124 mg por 100 g de materia seca (Cuadro 2.2), resultados que están por arriba de los encontrados por Collera-Zúñiga *et al.* (2005) y por Hervert-Hernandez *et al.* (2010). En chile guajillo y ancho; sin embargo, tal como lo indica Gomez-Garcia y Ochoa-Alejo (2013), el contenido de carotenoides está determinado por el tipo de cultivar y condiciones de

crecimiento; además, en el presente estudio se utilizó un número mayor de colectas procedentes de diferentes estados del país, en tanto que los trabajos arriba mencionados sólo utilizaron una única colecta por tipo de chile. Dentro de tipo de chile, las colectas CP-1138 de chile puya y CP-1113 de pasilla presentaron 143 y 148 mg por 100 g⁻¹ de materia seca de carotenoides totales, respectivamente (Cuadro 2.2).

En cuanto al efecto por localidad, en San Luis Potosí la acumulación de carotenoides fue superior, lo que podría deberse a que en esta localidad la temperatura promedio fue mayor que en Zacatecas, y coincide con lo mencionado por Hugueney *et al.* (1996) y Bouvier *et al.* (1998) en cuanto al efecto de la temperatura en la acumulación de este metabolito.

Para el caso de flavonoides, por localidad Zacatecas fue superior a San Luis Potosí, mientras que por tipo de chile el pasilla con 6.4 mg por 100 g de materia seca superó estadísticamente a guajillo y puya (Cuadro 2.2). Trabajos realizados también en México reportan para chile piquín una concentración de 50.1 mg por 100 g⁻¹ (Vera-Guzmán *et al.*, 2011), en pimiento 23.15 mg kg⁻¹ de peso fresco (Howard *et al.*, 2000), y en Cayenne 39 mg por 100 g⁻¹ de peso fresco (Tundis *et al.*, 2013). Como se puede ver, existe una amplia variación en las concentraciones de flavonoides en diferentes tipos de chile y los principales factores que afectan su contenido son el genotipo, estado de madurez del fruto y las condiciones de almacenamiento (Ross y Kasum, 2002).

Considerando carotenos y flavonoides, el mayor contenido de carotenoides se presentó en San Luis Potosí y el mayor contenido de flavonoides en Zacatecas, corroborando que no existe una asociación positiva entre ellos (Butcher *et al.*, 2012), ya que según Howard *et al.* (2000), el contenido bajo de flavonoides puede indicar un alto contenido en capsaicinoides, ya que comparten la misma ruta biosintética.

Cuadro 2.3. Comparación mediante la prueba de t para las colectas en San Luis Potosí y Zacatecas.

Tipo/ Colecta	Capsaicina (SHU)		Dihidrocapsaicina (SHU)		Capsaicinoides totales (SHU)	
	S.L.P.	Zac.	S.L.P.	Zac.	S.L.P.	Zac.
Guajillo						
CP-1119	5185	4543	1655	7459	6839	9794
CP-1121	8081*	3108	1317	1398	9398*	4506
CP-1128	11434	10340	5582*	4064	17016	14403
CP-1135	4264	6887	1931	7100	6195	13987
CP-1143	4870	4478	2679*	1723	7549	6002
CP-1175	7198*	4485	1888	3832	8397	8317
CP-1226	12141	4040	9692*	2967	24477	6670*
SLP101	4981	6379	2242	3498	7223	9877
SLP102	6322	7740	4847	4924	10884	12664
SLP103	8681	15074	2548	11872	10251	26946
SLP106	5189	4260	2335	2400	7524	6660
SLP1010	3996	4748	3266	2719	7261	7467
SLP1012	12124	5120	11142*	3307	21356*	7599
SLP1015	8895	4447	3294	2001	14006*	6448
SLP1020	8427	6067	7974*	3209	17710*	9275
Pasilla						
CP-951	8747*	4560	5927*	1910	14675*	6470
CP-952	5444*	4221	2278	1876	7722*	6097
CP-955	6715*	4994	3364*	2247	10073*	7241
CP-1113	7459*	5041	5270*	2534	12729*	7575
CP-1176	5935	4603	5733*	4122	11668*	8168
CP-1224	9558	11607	5220	6762	14777	18370
CP-1239	8870*	5124	5104*	2496	13975*	7621
CP-1242	8870*	3559	3997*	1739	12867*	5298
CP-1295	2900	4060	1305	3153	4205	6845
CP-1297	4807	3794	3852	3424	8659*	6871
CP-1298	3456	5928	2086	5687	5659	11615
Puya						
CP-1122	11918*	7145	6118*	3324	18037*	10374
CP-1127	21806	-	11500	-	33306	-
CP-1138	22427	-	11479	-	33906	-
CP-1169	20499	-	9810	-	30308	-
CP-1211	-	21996	-	9231	-	31227

* Diferencia significativa (Prueba de T $p \leq 0.05$) entre localidades para la variable y población respectiva. S.L.P.: San Luis Potosí; Zac.: Zacatecas.- Ausencia de muestra. SHU: Unidades Scoville de Picor.

En cuanto al color de chile, el guajillo y puya fueron similares en las variables hue y croma, ubicándolos en un tono de rojo intenso, siendo el puya el más brillante de los dos. El chile pasilla presentó una coloración rojo oscuro y poco brillante. Los tres tipos de chile se ubicaron en los tonos rojos, haciendo la diferencia en su color, el croma y la luminosidad.

Algunas colectas de chile presentan un mayor contenido de capsaicina y/o dihidrocapsaicina en San Luis Potosí, que fue el sitio donde se registró la temperatura más alta en comparación con Zacatecas; sin embargo, también existen colectas que presentaron mayor contenido de capsaicinoides en Zacatecas, y otras colectas mantuvieron cierta estabilidad en cuanto al contenido de capsaicinoides en ambas localidades. La expresión que mostraron los genotipos se debe a la interacción con el ambiente, a que existen rutas metabólicas que se comparten para la producción de estos metabolitos o a que existen materiales estables en diferentes ambientes, producto de la selección de los agricultores.

2.4. CONCLUSIONES

Las poblaciones de chile guajillo, pasilla y puya mostraron una importante variación en cuanto a los metabolitos secundarios que se cuantificaron, en particular la variación fue mayor en capsaicinoides.

Las poblaciones con mayor contenido de capsaicinoides en San Luis Potosí fueron: Para guajillo CP-1226, SLP-1012, SLP-1020; para pasilla CP-1224, CP-951 y CP-1239; para puya CP-1138 y CP-1127. Las poblaciones con mayor contenido de capsaicinoides en Zacatecas fueron: Para guajillo SLP-103, CP-1128 y CP-1135; para pasilla CP-1224 y CP-1298; para puya CP-1211.

Existe una relación entre la temperatura alta y la concentración de capsaicinoides y carotenoides, mientras que los flavonoides tuvieron una mayor acumulación bajo condiciones de menor temperatura.

Aunque los tres tipos de chile comparten tonos similares dentro de la gama de rojos, el croma y la luminosidad los diferencian entre sí.

2.5. AGRADECIMIENTOS

Al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, que brindó el financiamiento para esta investigación, a través de la Red Nacional de Chile del SINAREFI.

2.6. REFERENCIAS

- Aguilar-Meléndez A, P L Morrell, M L Roose y Seung-Chul K (2009)** Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany* 96:1190-1202.
- Aguilar-Rincón V H, T Corona T, P López L, L Latournerie M, M Ramírez M, H Villalón M y J A Aguilar C (2010)** Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- AOAC International (1998)** AOAC Official Method 995.03: Capsaicinoids in *Capsicums* and their extractives. *In: Official Methods of Analysis AOAC International* (ed). AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Barceloux D G (2009)** Pepper and Capsaicin (*Capsicum* and Piper Species). *Disease a Month* 55:380-390.
- Bellon M R, A F Barrientos-Priego, P Colunga-García M, H Perales, J A Reyes Agüero, R Rosales Serna y D Zizumbo-Villarreal (2009)** Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, *in: capital natural de México*. Vol 2:355-382.

- Butcher J D, K M Crosby, K S Yoo, B S Patil, A M H Ibrahim, D I Leskovar y J L Jifon (2012)** Environmental and Genotypic Variation of Capsaicinoid and Flavonoid Concentrations in Habanero (*Capsicum chinense*) Peppers. *HortScience* 47:574-579.
- Chang C C, M H Yang, H M Wen y J C Chern (2002)** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10:178-182.
- Collera-Zúñiga O, F García J. y R Meléndez G. (2005)** A comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry* 90:109-114.
- Contreras T A R, S López H, V Santacruz A, M Valadez E, Aguilar-Rincón V H, T Corona T y López A P (2011)** Diversidad genética en México de variedades nativas de chile poblano mediante microsátélites. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34(4):225-232.
- De Masi L, P Siviero, D Castaldo, D Cautela, C Esposito y B Laratta (2007)** Agronomic, chemical and genetic profiles of hot peppers (*Capsicum annuum* ssp.). *Molecular Nutrition Food Research* 51:1053-1062.
- DeWitt D y P W Bosland (2009)** The Complete Chile Pepper Book: A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving, and Cooking. Timber Press. 336 p.
- FAOSTAT (2015)** Datos de producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Dirección de Estadística. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consultado en enero de 2015.
- Giuffrida D, P Dugo, G Torre, C Bignardi, A Cavazza, C Corradini y G Dugo (2013)** Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* 140:794-802.
- Gomez-Garcia M R y N Ochoa-Alejo (2013)** Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Science* 14:19025-19053.
- González-Zamora A, E Sierra-Campos, J G Luna-Ortega, R Pérez-Morales, J C Rodríguez Ortiz y J L García-Hernández (2013)** Characterization of different *Capsicum* varieties by evaluation of their capsaicinoids content by High Performance Liquid Chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. *Molecules* 18:13471-13486.
- Gurung T, S Techawongstien, B Suriharn y S Techawongstien (2011)** Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* spp. *HortScience* 46:1576-1581.
- Guzmán I, P W Bosland y M A O'Connell (2011)** Heat, color, and flavor compounds in *Capsicum* fruit. In: The Biological Activity of Phytochemicals, Recent Advances in

Phytochemistry 41. D R Gang (ed). Springer Science Business Media, Inc., New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp: 109-126.

Hervert-Hernandez D, S G Sayago-Ayerdi y I Goni (2010) Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:3399-3406.

Howard L R, S T Talcott, C H Brenes y B Villalon (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1713-1720.

Laborde-Cancino J A y O Pozo-Campodónico (1982) Presente y Pasado del Chile en México. Publicación especial INIA No. 85. México D. F. 80 p.

Long T, J (2009) Los senderos prehispánicos del *Capsicum*. In: Caminos y mercados de México. Instituto de Investigaciones Históricas Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Antropología e historia. Serie Historia General 23. p 79-106.

McGuire R G (1992) Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27:1254-1255.

Meneses-Reyes J C, Soto-Hernández R M, T Espinosa-Solares y M E Ramírez-Guzmán (2008) Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia* 42:425-433.

Morán-Bañuelos S H, Aguilar-Rincón V H, T Corona T, Castillo-González F, Soto-Hernández R M y R San Miguel-Chávez (2008) Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia* 42:807-816.

Moreno-Pérez E d C, C H Avendaño-Arrazate, R Mora-Aguilar, J Cadena-Iñiguez, V H Aguilar-Rincón y J F Aguirre-Medina (2011) Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (*Capsicum annuum* L.) del Centro-Norte de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17:23-30.

Nagata M y I Yamashita (1992) Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39:925-928.

Palma Tenango M (2014) Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) y descriptores varietales. Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. p 61-64.

Piñero D, J Caballero-Mellado, D Cabrera-Toledo, C E Canteros, A Casas, S A Castañeda, A Castillo, R Cerritos, O Chassin-Noria, P Colunga-GarcíaMarín, P Delgado, P Díaz-Jaimes, L E Eguiarte, A E Escalante, B Espinoza, A Fleury, R S Flores, G Fragoso, J González-Astorga, V V Islas, E Martínez, F Martínez, J Martínez-Castillo, Y A Mastretta, R Medellín, L Medrano-González, F Molina-Freaner, V B Morales, V A Murguía, E Payró de la Cruz, M R Reyes-Montes, S M R Robles, G

- Rodríguez-Arellanes, B L Rojas, R Romero-Martínez, J H Sahaza-Cardona, S L R., E Sciuotto, B C Scott, U Y Schramm, C Silva, V Souza, M L Taylor, R J Urbán, M Uribe-Alcocer, C M d J Vázquez, E Vázquez-Domínguez, P A Vovides, A Wegier, R A Zaldívar y G Zúñiga (2008)** La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *In: Capital natural de México. Conabio (ed) Vol I : Conocimiento actual de la biodiversidad. México. pp: 437-494.*
- Pino J, M Gonzalez, L Ceballos, A R Centurion-Yah, J Trujillo-Aguirre, L Latournerie-Moreno y E Sauri-Duch (2007)** Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry* 104:1682-1686.
- Pozo C O, S Montes y E Redondo (1991)** Chile (*Capsicum* spp.). *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. R Ortega P, G Palomino H, F Castillo G, V A González H y M Livera M (eds). Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Mexico. pp: 217-238.*
- Ross J A y C M Kasum (2002)** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22:19-34.
- Sanatombi K y G J Sharma (2008)** Capsaicin content and pungency of different *Capsicum* spp. cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Clu-Napoca* 36:89-90.
- Santamaría R I, M D Reyes-Duarte, E Bárzana, D Fernando, F M Gama, M Mota y A López-Munguía (2000)** Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3063-3067.
- SAS Institute (2011).** SAS User's Guide: Statistics. Version 9.3. Statistic Analysis System Institute. Cary, North Carolina, USA. 1032 p.
- Vázquez-Flota F, M d L Miranda-Ham, M Monforte-González, G Gutiérrez-Carbajal, C Velázquez-García y Y Nieto-Pelayo (2007)** La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37:353-360.
- Vera-Guzmán A M, J L Chávez-Servia, J C Carrillo-Rodríguez y M G López (2011)** Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, México. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71:578-585.
- Wall M M, C A Waddell y P W Bosland (2001)** Variation in b-carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *HortScience* 36:746-749.
- Zhang D y Y Hamauzu (2003)** Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Science of Functional Foods. Vol.1(2) : 22-27.*

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN CENTRAL DE CHILE

GUAJILLO Y PASILLA

CHARACTERIZATION OF CHILE GUAJILLO AND PASILLA CORE COLLECTION

Verónica Trujillo-Pahua¹, Tarsicio Corona-Torres^{1*}, Víctor Heber Aguilar-Rincón¹,

Higinio López-Sánchez² y Moisés Ramírez Meraz³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco C.P. 56230, Estado de México, México.

²Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205, Santiago Momoxpan, Municipio de San Pedro Cholula. C.P. 72760, Puebla, México.

³INIFAP-Campo las Huastecas. Km. 55 Carretera Tampico-Mante, Villa Cuahutémoc. C.P. 89610, Tamaulipas, México.

**Autor para correspondencia (tcoronat@colpos.mx)*

RESUMEN

México es considerado centro de domesticación y de diversificación de *C. annuum* L. Actualmente, problemas como plagas, enfermedades y el uso de variedades mejoradas ponen en riesgo su conservación y aprovechamiento, lo que resalta la necesidad de realizar estudios de caracterización de su diversidad. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar molecularmente las colectas centrales de chile guajillo y pasilla, mediante 15 loci de microsatélites, para determinar parámetros de diversidad y estructura genética, con lo que se generará conocimiento específico de estos tipos de chile, además se analizaron cinco poblaciones de chile puya. Los parámetros de diversidad genética mostraron 137 alelos, 7.67 alelos por locus para el chile guajillo, 6.47 alelos para pasilla y 5.27 para puya. Se detectó un polimorfismo general de 88.9%. La heterocigosidad esperada (H_e) para estos tres tipos de chile fue de 0.635, encontrando un exceso de heterocigotos en sus poblaciones. La F_{st} mostró un 14.47% de variación entre tipos de chile, aunque la mayor diversidad se detectó dentro de las poblaciones (85.57%). El valor -0.1443 de F_{is} expuso que un 14.43% de la diversidad está dentro de las accesiones, y 0.0216 de F_{it} indicó que a nivel de población hay una deficiencia de heterocigotos. Con las 31 poblaciones se formaron cuatro grupos, uno con las poblaciones de guajillo, otro con las de puya más dos colectas de guajillo y pasilla integradas a este grupo, el tercer y cuarto grupo formado por colectas de pasilla ubicadas en distintos cuadrantes. En el dendrograma los chiles guajillo y puya no mostraron una relación genética directa, ya que guajillo comparte alelos con algunas poblaciones de pasilla y éste último comparte alelos también con puya. Se detectó amplia variabilidad genética dentro de las accesiones de cada tipo de chile, lo que se puede utilizar en programas de mejoramiento genético y conservación.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, diversidad genética, estructura genética, microsatélites.

SUMMARY

Mexico is considered as a center of origin and domestication of *C. annuum*. Currently, problems such as pests, diseases and adoption of improved varieties increase the risk conservation, causing its loss. Therefore, the goal of this research was to molecularly characterize two core collections of chile, one of guajillo and one of pasilla, and five accessions of chile puya, using 15 microsatellite loci to determine parameters of genetic diversity and structure. Genetic diversity parameters showed 137 alleles, 7.67 alleles per locus for chile guajillo, 6.47 alleles for chile pasilla, and 5.27 alleles for chile puya. A general polymorphism of 88.9% was detected. The expected heterozygosity (H_e) for these three types of chile was 0.635, finding an excess of heterozygotes in their populations. The parameter F_{st} showed a 14.43% variation among types of chile, and the greatest diversity was found among accessions within types of chile with 85.57%. Four groups were formed from the 31 accessions with the principal components and conglomerates analysis. The first group was formed with chile guajillo accessions, the second group includes puya, guajillo and pasilla accessions, and the third and fourth groups were formed of pasilla accessions located in different quadrants. The puya and guajillo types showed no direct genetic link, whereas guajillo shared alleles with some populations of pasilla, and the latter shared alleles with puya. Diversity found in this study indicates a high level of variability, and this variability is greater within accessions than it is among types of chile, therefore accessions can be classified and used in *Capsicum* breeding programs.

Key words: *Capsicum annuum*, genetic diversity, genetic structure, microsatellite.

3.1. INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* L. comprende aproximadamente 32 especies, de las cuales cinco son domesticadas: *Capsicum annuum*, *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., y *C. pubescens* Ruiz & Pav (Barboza, 2011). De las cinco especies domesticadas, *Capsicum annuum* es la más importante en el mundo, y en particular para México, debido a que es considerado centro de domesticación y por lo tanto registra una amplia diversidad (Kraft *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 1991). Entre los chiles con mayor importancia en México están los tipo serrano, jalapeño, guajillo, ancho, pasilla, de árbol, puya, piquín, habanero y manzano (Hernández-Verdugo *et al.*, 1999; Laborde-Cancino y Pozo-Campodonico, 1982; Pozo *et al.*, 1991).

Debido a que los recursos fitogenéticos se están perdiendo o erosionando por factores bióticos y abióticos (Livera *et al.*, 2000), es necesario conservarlos y utilizarlos. Por lo anterior se requiere conocer estos recursos mediante su caracterización, que puede ser morfológica, bioquímica o molecular. Sin embargo cuando es una colecta muy amplia resulta caro e impráctico, ya que el material recolectado puede estar duplicado, por lo que es recomendable formar colecciones núcleo, las cuales cubren la mayor parte de la diversidad con un número reducido de accesiones (Frankel, 1984).

Para el conocimiento de una especie y su mejoramiento genético, el uso de marcadores morfológicos o moleculares son herramientas útiles (Azofeifa-Delgado, 2006). Los marcadores moleculares pueden ser de proteínas (isoenzimas) y de DNA (Minamiyama *et al.*, 2006). Entre los marcadores moleculares de DNA se encuentran los RFLP, RAPD, AFLP, SSR, SNP, SCAR y los CAPS, de los cuales uno de los más utilizados en plantas son los microsatélites (SSR), técnica altamente reproducible y codominante (Alvarez, 2011). Los microsatélites son repeticiones de secuencias cortas de nucleótidos (mono, di, tri, tetra o penta nucleótidos),

abundantes y relativamente uniformes a lo largo del genoma en eucariontes (Tautz y Renz, 1984).

La caracterización molecular ha sido utilizada para analizar la diversidad y similitud de poblaciones conservadas *in situ* y *ex situ* (Votava *et al.*, 2002), la relación genética entre diferentes tipos de chile (Ved *et al.*, 2013; Rana *et al.*, 2014; Thul *et al.*, 2012), así como para estudiar los mecanismos de mutación y evolución de la especie *C. annuum* (Stágel *et al.*, 2009). De los estudios realizados hasta ahora, aun no existe suficiente información del género *Capsicum* para conocer la diversidad genética (Piñero *et al.*, 2008).

Entre los trabajos realizados en el Colegio de Postgraduados se encuentran la caracterización morfológica de chile guajillo (80 accesiones) y pasilla (30 accesiones), a partir de la cual se seleccionaron las accesiones para formar una colección central de cada tipo. Debido a la importancia de la conservación y uso de recursos fitogenéticos de manera óptima, el objetivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente la colección central de chile guajillo y pasilla mediante microsatélites.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

El material utilizado en este trabajo se muestra en el Cuadro 3.1, y consistió en 15 accesiones de chile guajillo y 11 de chile pasilla, las cuales están formadas por accesiones que provienen de diferentes entidades de México. Estas dos colecciones centrales representan la variabilidad de 80 y 30 accesiones de cada uno de los tipos de chile. En el presente estudio además se incluyeron cinco colectas de chile puya, debido a que se le considera una variante del chile guajillo, por su similitud morfológica (Santamaría *et al.*, 2000; Wall *et al.*, 2001).

Cuadro 3.1. Procedencia de las poblaciones de chile guajillo, pasilla y puya.

Tipo de chile	Colecta	Edo.	Municipio	Latitud†	Longitud†	Altitud. (msnm)†
Guajillo	CP-1119	S.L.P.	Villa de Ramos	23°04'33.06"	102°09'07.15"	1989
	CP-1121	Zac.	Vetagrande	22°54'50.10"	102°25'39.8"	2099
	CP-1128	Zac.	Guadalupe	22°57'20.2"	102°24'5.6"	2061
	CP-1135	Zac.	Calera	22°55'54.82"	102°43'33.31"	2190
	CP-1143	Zac.	Calera	22°52'51.67"	102°43'14.42"	2195
	CP-1175	Zac.	Villa de Cos	23°04'14.66"	102°38'32.39"	2095
	CP-1226	Ags.	Cosío	22°22'42.7"	102°16'45.2"	1779
	SLP 101	S.L.P.	Moctezuma	22°47'29"	100°57'36"	1630
	SLP 102	S.L.P.	Moctezuma	22°47'29"	100°57'36"	1630
	SLP 103	S.L.P.	Moctezuma	22°48'06"	100°57'24"	1637
	SLP 106	S.L.P.	Moctezuma	22°45'04"	100°58'34"	1649
	SLP-1010	S.L.P.	Villa de Ramos	22°47'49"	102°5'40"	2047
	SLP-1012	S.L.P.	Villa de Ramos	22°47'52"	102°2'38"	2048
	SLP-1015	S.L.P.	Villa de Ramos	23°00'28"	102°11'20"	1987
	SLP-1020	S.L.P.	Villa de Ramos	23°06'56"	102°9'23"	1974
Pasilla	CP-951	Mich.	Queréndaro	19°48'51.01"	100°52'55.10"	1850
	CP-952	Mich.	Queréndaro	19°48'51.01"	100°52'55.10"	1850
	CP-955	Mich.	Queréndaro	19°48'21.56"	100°54'8.00"	1850
	CP-1113	Zac.	Vetagrande	22°54'0.09"	102°26'0.02"	2105
	CP-1176	Zac.	Villa de Cos	23°04'14.66"	102°38'32.39"	2095
	CP-1224	Ags.	Cosío	22°22'42.7"	102°16'45.2"	1779
	CP-1239	Gto.	San Felipe	21°07'55.4"	100°44'28.9"	1885
	CP-1242	Gto.	San Felipe	21°43'19.4"	101°01'41.7"	1862
	CP-1295	Jal.	Ojuelos	21°54'46.5"	101°40'0.9"	2147
	CP-1297	S.L.P.	Villa de Ramos	21°53'7.5"	100°53'12.6"	1805
	CP-1298	S.L.P.	Villa de Ramos	21°47'42.4"	100°58'50.3"	1835
Puya	CP-1122	Zac.	Vetagrande	22°54'50.1"	102°25'39.8"	2099
	CP-1127	Zac.	Pánuco	20°02'59.6"	102°26'2.4"	2037
	CP-1138	Zac.	Calera	22°55'22.42"	102°44'48.75"	2213
	CP-1169	Zac.	Villa de Cos	23°04'14.66"	102°38'32.39"	2095
	CP-1211	Zac.	Ojo Caliente	23°31'54.82"	102°08'03.07"	2075

†Georreferenciación en el lugar de colecta.

3.2.2. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se germinaron *in vitro* 20 semillas de cada accesión. Cuando las plántulas desarrollaron dos hojas verdaderas se extrajo el ADN de doce individuos por separado, empleando el kit comercial ChargeSwitch® gDNA Plant Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). La extracción de DNA se hizo mediante un robot para extracción de ácidos nucleicos KingFisher Flex® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La concentración del DNA se homogeneizó a 20 ng/μl para todas las muestras, y se almacenaron en una microplaca a -80° C hasta su uso.

3.2.3. Amplificación de los loci de microsatélites

Se utilizaron 15 loci de microsatélites con etiquetas fluorescentes azul (6-FAM) y verde (HEX) (Applied Biosystems) en el extremo 5' (Cuadro 3.2), de acuerdo a los marcadores utilizados por (Lee *et al.*, 2004) y (Contreras *et al.*, 2011). La temperatura de alineamiento de los marcadores se determinó de manera individual, mediante gradientes de temperatura y se formaron grupos con el programa MultiPLX (Kaplinski *et al.*, 2004) para realizar PCR múltiple.

La amplificación del DNA mediante PCR se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700® (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94 °C durante cuatro minutos, posteriormente 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por un minuto, etapa de alineamiento por un minuto (rango de 55 a 65.1 °C), y extensión a 72 °C por dos min, con una extensión final de 12 min.

La mezcla de reacción para PCR múltiple en 25μl fue: 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen), 1X de solución buffer, 3 mM de MgCl₂, 1U de TaqPol (Promega), 10 pmol de cada iniciador y 40 ng de ADN (Contreras *et al.*, 2011).

Cuadro 3.2. Loci de microsatélites, etiqueta y temperatura de alineamiento.

Grupo	Locus	Tamaño del fragmento (pb)	Etiqueta	Temperatura de alineación (°C)	Unidad repetitiva
1	Hpms 1-1	254-285	6-FAM	56°	(CA) ₁₂ (TA) ₄
	Hpms 1-6	185-197	HEX		(AT)2(GT)4(AT)8(GT)13
	Hpms AT2-14	173-200	6-FAM		(AAT) ₁₆ IMP
2	Hpms 1-5	281-323	6-FAM	61°	(AT) ₁₁ (GT) ₁₇
	Hpms 1-106	156-164	HEX		(AAAAAT) ₄
	AF244121	237-243	6-FAM		(TTG) ₅ IMP(AT) ₆ IMP(GT) ₃ IMP
3	Hpms 1-168	155-208	HEX	59.7°	(TA) ₁₇ (GA) ₁₂
	CM0005	152-160	6-FAM		(CCA) ₈
4	Hpms 1-111	145-180	HEX	55°	(AAT) ₁₁
	Hpms 2-24	182-205	6-FAM		(CT) ₁₇ (CA) ₅ A ₂₁
5	Hpms 1-143	220-232	6-FAM	56°	(AG) ₁₂
	Hpms 1-173	156-179	HEX		(GA) ₁₆ (TG) ₂
	Hpms 2-2	146-151	6-FAM		(GT) ₉
6	Hpms 1-214	88-108	6-FAM	58°	(AAT) ₁₆ IMP
	Hpms 1-274	162-180	HEX		(GTT) ₇

3.2.4. Análisis de fragmentos y análisis estadístico

Los fragmentos de DNA obtenidos de la PCR se analizaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems), para ser procesados con el programa GeneMapper® V. 4.0 (Applied Biosystems, 2006).

Se determinaron los parámetros de diversidad genética con las frecuencias alélicas poblacionales para obtener el número de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos (frecuencia del alelo más común ≤ 0.95), y heterocigosidad observada y esperada con el programa POPGENE (Yeh *et al.*, 1999). Se estableció la estructura genética de las poblaciones mediante los estadísticos de F de Wright, calculados a partir de las frecuencias genotípicas en cada locus. Se realizó un análisis de componentes principales para determinar los marcadores

que explicaron en mayor grado la variabilidad de las colectas (Pla, 1986), con base en la matriz de correlaciones generada a partir de las frecuencias alélicas empleando el programa SAS V.9.4 (SAS Institute Inc., 2014). También se determinó la agrupación de las poblaciones a partir del total de los marcadores evaluados, utilizando la distancia genética de Rogers modificada por Wright (1978) y el programa NTSYSpC® V.2.1p (Rohlf, 2000).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Diversidad Genética

En las 26 poblaciones que conforman las colectas centrales de los chiles tipo guajillo y pasilla, y en las cinco poblaciones de chile puya, los loci utilizados resultaron polimórficos, excepto Hpms 1-143. Se identificaron 137 alelos en total y un número promedio de alelos por locus de 9.13 (Cuadro 3.3). El número de alelos por tipo de chile varió de 76 (chile puya) a 114 (chile guajillo), encontrándose la mayoría de los alelos o loci presentes en los tres tipos de chile, excepto el CM0005 y el Hpms 1-168, que estuvieron ausentes en puya.

Los alelos que se presentaron con mayor frecuencia fueron: Hpms 1-1, Hpms 1-5, Hpms 2-24, Hpms 2-14 y Hpms 1-274. El número de alelos por locus encontrado en este trabajo estuvo por arriba de los encontrados en otros estudios como el de Contreras *et al.* (2011), quienes al utilizar 19 loci de microsatélites encontraron 105 alelos y 5.53 alelos por locus en un subtipo de chile ancho, y el de Yumnam *et al.* (2012), que con 25 loci de microsatélites en 56 poblaciones reportaron 5.36 alelos por locus. En otros trabajos se han encontrado un mayor número de alelos por locus (14.5), donde utilizaron 10 loci de microsatélites y 260 poblaciones del género *Capsicum* (Ibiza *et al.*, 2012). Estas diferencias se pueden deber al número de accesiones analizadas, a que fueron distintos tipos de chile y diferentes especies. El número de alelos y el número de alelos por locus encontrado sugieren que la diversidad de las poblaciones de guajillo,

pasilla y puya es alta, y como menciona Votava *et al.* (2005), la diversidad es mayor en los centros de domesticación de las especies y a México se le considera centro de domesticación de *Capsicum annuum* (Kraft *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 1991).

En general, el polimorfismo en las 31 poblaciones fue de 88.89%; las de chile guajillo y pasilla presentaron los valores más altos y las de puya un porcentaje menor (Cuadro 3.3). Al respecto, Pacheco-Olvera *et al.* (2012) reportaron un polimorfismo del 89.29% en materiales silvestres, 80.16% en criollos y un 93.20% en híbridos, que incluyeron una muestra de chile guajillo y una de pasilla. El porcentaje alto de polimorfismo presentado se debe, según Loaiza-Figueroa *et al.* (1989), a que existe variación genética entre poblaciones de diferentes regiones geográficas, mientras que Aguilar-Meléndez *et al.* (2009) mencionan que la variación se debe al flujo de genes durante el proceso de domesticación, lo que provocó posteriormente la diferenciación entre poblaciones, y actualmente esta variación es causada por la selección y deriva génica (Hernández-Verdugo *et al.*, 2008).

Por otro lado, el valor encontrado para la heterocigosidad esperada (H_e) fue de 0.635, lo que sugiere que en los chiles guajillo, pasilla y puya existe una alta probabilidad de encontrar heterocigotos en sus poblaciones (Cuadro 3.3). Monteiro *et al.* (2013) reportaron en poblaciones de *C. annuum* valores más altos de H_o con respecto a la H_e , lo que indicó un déficit de homocigotos; así, mientras que las poblaciones de chile poblano utilizadas por Contreras *et al.* (2011) mostraron una H_e de 0.395, en las poblaciones de guajillo y pasilla utilizadas por Pacheco-Olvera *et al.* (2012) se registró una H_e de 0.44. Todos estos valores son relativamente menores a los encontrados en este análisis, lo que indica que hay una alta variación dentro de tipos de chile, que puede ser generado por diferencias en la sensibilidad al ambiente o plasticidad fenotípica de los individuos de la población (Hernández-Verdugo *et al.*, 2008).

Cuadro 3.3. Parámetros de diversidad genética para los chiles guajillo, pasilla y puya.

Tipo	NP	A	AL	PLP	He	Ho
Guajillo	15	114	7.60	93.33	0.653	0.609
Pasilla	11	97	6.47	93.33	0.608	0.633
Puya	5	76	5.07	80	0.643	0.605
TOTAL	31	137	9.13	88.89	0.635	0.616

NP: número de poblaciones; A: número de alelos; AL: alelos por locus; PLP: porcentaje de loci polimórficos; He: heterocigosidad esperada; Ho: heterocigosidad observada.

Los estudios de diversidad de chiles en México permiten darles una aplicación en el mejoramiento genético, ya que éstos se pueden utilizar para resolver algunos problemas de producción, siempre y cuando el germoplasma sea de poblaciones representativas que permitan obtener información robusta del género (Pérez-Castañeda *et al.*, 2015). La mayor parte de la diversidad de una especie puede ser encontrada dentro de poblaciones o entre poblaciones diferentes (Rao y Hodgkin, 2002).

La conservación, la dirección y el mejoramiento de la especie *C. annuum* requiere la evaluación de su variación genética (Ibarra-Torres *et al.*, 2015). El uso de microsatélites es de utilidad para establecer relaciones genéticas y evaluar la diversidad, con lo que se pueden tomar decisiones para llevar a cabo programas de conservación y mejoramiento (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

3.3.2. Estructura genética

El análisis de la estructura genética mediante los estadísticos de F de Wright se presentan en el Cuadro 3.4. El valor de F_{is} fue negativo para los tres tipos de chile, con un promedio general de -0.1443, lo que indica que hay un exceso de heterocigotos. Los valores de F_{is} de chile guajillo (-

0.128) y de pasilla (-0.218) indicaron la existencia de un exceso de heterocigotos en comparación con las colectas de chile puya, cuyo valor fue cercano a cero.

Estos valores son inferiores a los reportados por Monteiro *et al.* (2013), quienes obtuvieron un valor de F_{is} para *C. annuum* de -0.775, atribuible al proceso de adaptación y selección por el que pasaron las poblaciones que analizaron. Se puede considerar que las accesiones usadas en este trabajo han tenido una presión de selección menor, de aquí que los valores obtenidos de F_{is} sean menores y muy similares a los de otros tipos de chile nativos de México (Contreras *et al.*, 2011). Por otro lado, el exceso de heterocigotos encontrados, a pesar de que *C. annuum* es considerada una planta autógama, se debe a que presentan cierto grado de alogamia (Castañon-Najera *et al.*, 2014).

Las poblaciones de chile guajillo, pasilla y puya presentaron valores F_{st} de 0.1788, 0.1395 y 0.1159, respectivamente, indicadores de una diferencia interpoblacional grande para chile guajillo y moderada para los otros dos tipos de chile (Wright, 1978), lo que concuerda con lo observado en su morfología, ya que el chile guajillo presenta una mayor variabilidad en la forma de fruto que los tipos pasilla y puya. En general, la variación total dentro de poblaciones fue de 85.53%, y la variación entre poblaciones de 14.47%, dado que el valor promedio de F_{st} fue de 0.1447. Esta variación puede deberse al proceso de selección y adaptación a distintas áreas de producción donde se han introducido como nuevos cultivos (Hernández-Verdugo *et al.*, 2008).

En forma general, existe una ligera pérdida de heterocigotos en los tres tipos de chile, dado que el valor promedio de F_{it} fue de 0.0216, por lo que hay una tendencia a fijar alelos en cada subpoblación. Lo anterior se explica debido a que el chile es una especie autógama con cierto porcentaje de alogamia. En las tres poblaciones de chile, y de acuerdo a sus valores de F_{it} , existe una pérdida de heterocigotos, siendo mayor en el chile pasilla (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Estadísticos de F para las 31 poblaciones de chile guajillo, pasilla y puya.

Tipo	F_{is}^{\dagger}	F_{it}^{\ddagger}	F_{st}^{\S}
Guajillo	-0.1283	0.0735	0.1788
Pasilla	-0.2188	-0.0488	0.1395
Puya	-0.0857	0.0401	0.1159
General	-0.1443	0.0216	0.1447

[†]Endogamia dentro de accesiones; ^{‡‡}Diferenciación de accesiones; [§] Coeficiente global de endogamia.

3.3.3. Relación entre poblaciones

Con base en el análisis de componentes principales (ACP), el 51.9% de la variación total de las poblaciones de chile estudiadas fue explicada por los primeros siete componentes principales; de ellos, el primero y segundo explicaron 11.9% y 10.1%, respectivamente, mientras que el CP3, CP4 Y CP5 fueron muy similares y explicaron 7.5, 6.6 y 5.7%. Los alelos más importantes por su contribución al primer y segundo componente se muestran en el Cuadro 3.5.

Cuadro 3.5. Valores propios, proporción de varianza explicada, acumulada y alelos con mayor influencia para los primeros 7 componentes principales.

CP	VP	PV (%)	VA (%)	Alelos con mayor aporte para cada componente
1	16.35	11.9	11.9	Hpms 1-274, Hpms 2-14, AF244121
2	13.85	10.1	22	Hpms 1-1, Hpms 1-111, Hpms 2-24, Hpms 1-173, Hpms 2-14, Hpms2-2
3	10.26	7.5	29.5	HpmsAT2-14, Hpms1-6, CM0005, Hpms1-168, Hpms 2-24, Hpms 1-173
4	9.05	6.6	36.1	Hpms 1-1, Hpms 1-6, AF244121, Hpms 1-5, Hpms 2-24, Hpms 1-173, Hpms 1-274
5	7.93	5.7	41.9	Hpms 1-1, Hpms 1-5, Hpms 2-2, Hpms 1-274
6	7.06	5.1	47.1	Hpms 1-1, Hpms 1-6, Hpms AT2-14, AF244121, Hpms 1-5, Hpms 1-173, Hpms 2-14
7	6.55	4.7	51.9	Hpms 1-1, Hpms 1-6, HpmsAT2-14, Hpms 1-5, Hpms2-24, Hpms1-173

CP: Componente principal; VP: Valores propios; PV: Proporción de la varianza; VA: Varianza acumulada.

Con los dos primeros componentes principales se construyó una gráfica bidimensional, donde se puede observar la formación de cuatro grupos de poblaciones distribuidas en los cuatro cuadrantes del gráfico (Figura 2.1). El mayor de ellos, fue integrado por las poblaciones de chile guajillo entre el primero y segundo cuadrante, siendo éste el que tiene la más amplia dispersión. En el cuadrante III se agruparon las poblaciones de chile puya, junto con la colecta CP-1226 de chile guajillo y la CP-1224 de chile pasilla, por lo que es probable que estas dos colectas presenten alelos similares con el tipo puya. Las poblaciones de chile pasilla formaron dos grupos definidos, uno ubicado entre los cuadrantes III y IV, donde se encuentran las poblaciones procedentes de San Luis Potosí, Guanajuato, Aguascalientes y Jalisco, y el otro entre el cuadrante I y IV, que corresponden a las poblaciones de Zacatecas y Michoacán. Esta distribución puede que corresponda con el movimiento de semilla de chile que se da normalmente entre las distintas zonas productoras, de tal forma que colectas con el mismo origen puedan estar contenidas en un mismo grupo.

Los grupos observados en la gráfica de dispersión (Figura 2.1) fueron similares a los derivados del análisis de conglomerados (Figura 2.2), donde se indican las relaciones genéticas de similitud, lo cual señala una consistencia en la formación de los grupos.

En el dendrograma (Figura 2.2) se pueden observar cuatro grupos y se distinguen dos poblaciones que forman un grupo externo con dos poblaciones aisladas (PA) que fueron la CP-1119 y la CP-1128 de chile guajillo, a una distancia de 0.338, colectas presentes en el extremo superior del cuadrante II de la Figura 3.1. El primer y segundo grupo están compuestos en su mayoría por accesiones de tipo de chile guajillo, aunque en el primero están también incluidas las colectas CP-951 y CP-952 del tipo pasilla de Michoacán, y en el segundo las colectas de chile pasilla CP-955 de Michoacán y CP-1113 y CP-1176 de Zacatecas. Estas cinco colectas de chile pasilla son las mismas que se

distribuyen entre el cuadrante I y IV de la Figura 2.1. El tercer grupo se conformó de las colectas de pasilla de San Luis Potosí, Guanajuato, Aguascalientes y Jalisco, y las colectas de chile tipo puya CP-1122, CP-1127 y CP-1138 de Zacatecas. En este caso, las colectas de chile pasilla corresponden al grupo del cuadrante III y IV ubicado en la parte inferior de la Figura 2.1. Finalmente, el grupo IV se formó por dos colectas del tipo puya.

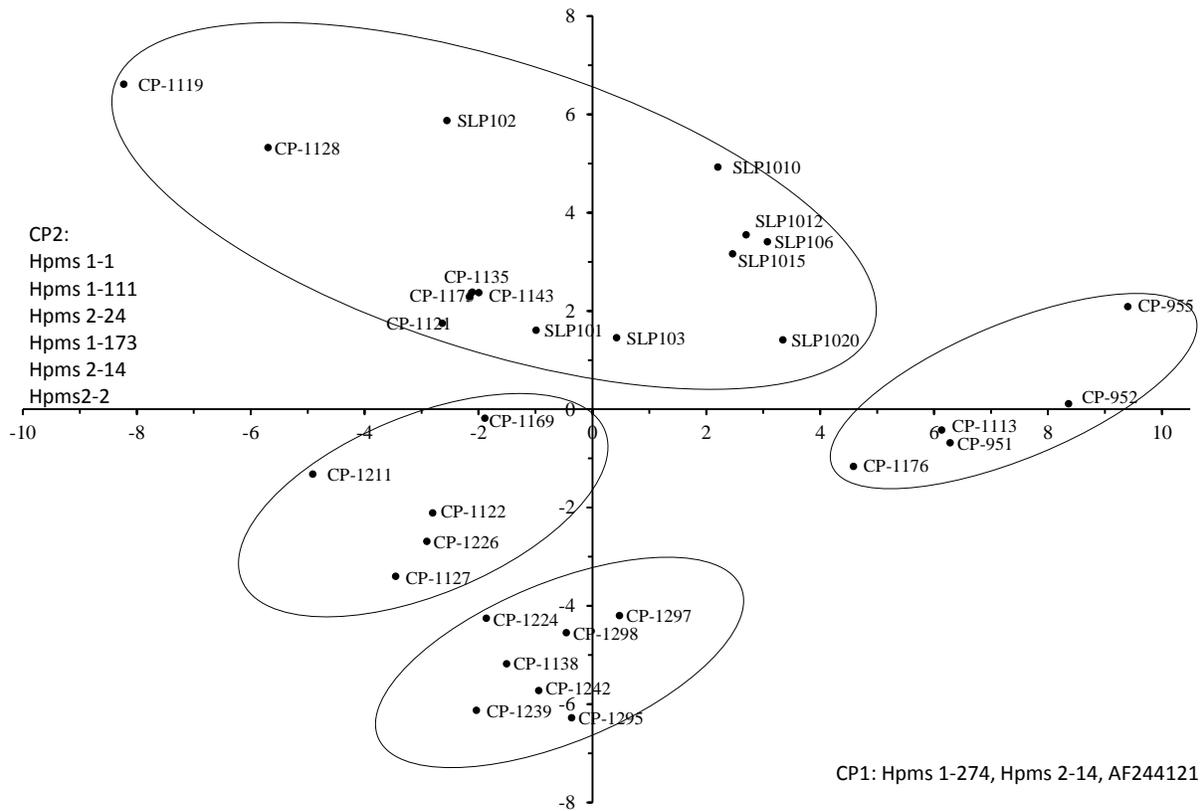


Figura 2.1. Dispersión de 31 poblaciones de chile con base en los dos primeros componentes principales.

Las relaciones genéticas entre las poblaciones mostradas en las Figuras 3.1 y 3.2 indican que el chile guajillo comparte un mayor número de alelos con el subgrupo de chile pasilla formado por las poblaciones que proceden de Michoacán y Zacatecas; el otro subgrupo de pasilla lo

comparten principalmente con uno de chile puya. El hecho de que el tipo de chile guajillo comprenda dos de los cuatro grupos formados, más dos accesiones externas, coincide con lo observado en campo, donde la variación de frutos de chile guajillo fue mayor a la de los otros dos tipos de chile. Esta mayor variación de los chiles guajillo puede ser debida a que la superficie cultivada es mayor que la de chile pasilla y esta última supera a la de chile puya; por lo tanto se esperaría mayor variación en guajillo por su adaptación a diferentes condiciones ambientales, lo que se ve reflejado en el mayor número de alelos (A) y alelos por locus (AL).

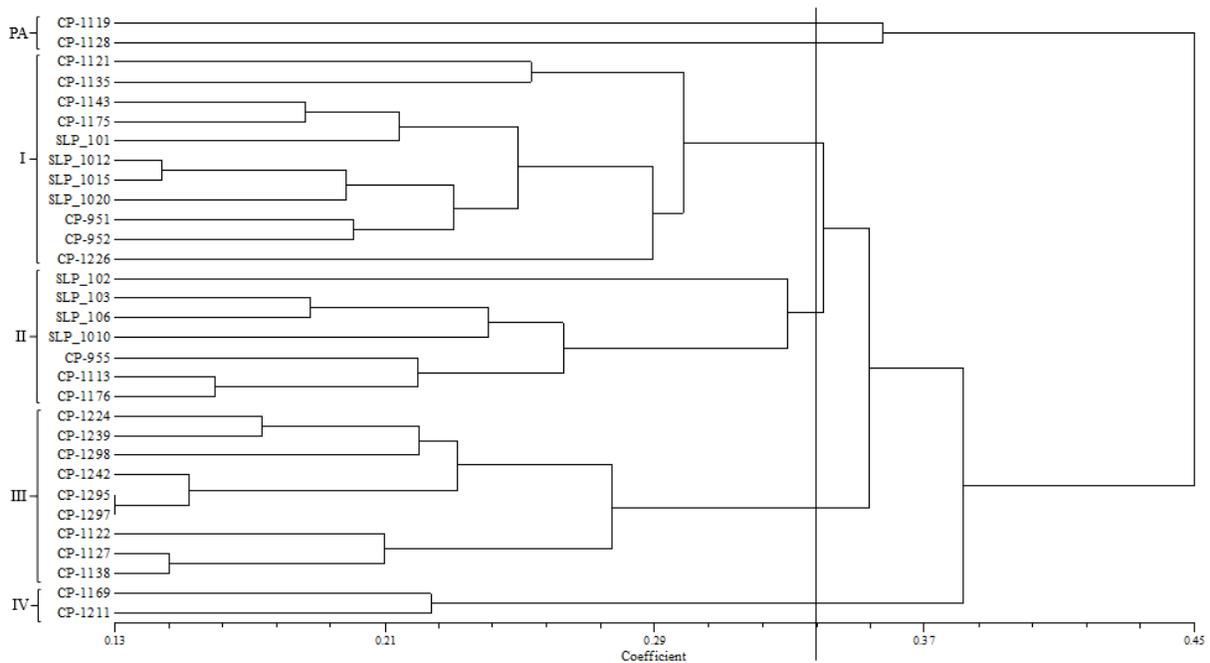


Figura 2.2. Dendrograma a partir de 137 alelos de SSRs de 31 poblaciones de *Capsicum annum*. (PA: Poblaciones aisladas de guajillo; I-IV: Grupos).

En cambio el pasilla, si bien no tiene tan amplia superficie, se cultiva de manera importante en áreas contrastantes como la de Michoacán con respecto a la zona más compacta de Guanajuato, Jalisco, San Luis Potosí y Zacatecas, por lo que se esperaría que entre ellas existiera mayor

diferencia genética. El grupo de chile pasilla de Calera Zacatecas y el de Queréndaro Michoacán presentaron una similitud que puede deberse al intercambio de semilla entre zonas.

El análisis morfológico previo (datos no mostrados), de donde se formaron las colectas centrales de los chiles guajillo y pasilla, presentó consistencia en su agrupamiento con los resultados del presente trabajo, donde se analizaron las mismas accesiones. En el dendrograma del análisis morfológico el primer grupo estuvo formado por siete colectas de chile pasilla y la colecta CP-1119 de guajillo. En el segundo grupo se unieron seis colectas de chile guajillo. El tercer grupo estuvo integrado por cuatro colectas de chile guajillo y cuatro colectas de chile pasilla. El cuarto grupo estuvo compuesto de cuatro colectas de chile guajillo. El chile puya formó un grupo definido con sus cinco poblaciones.

La similitud parcial observada entre los resultados morfológicos y los moleculares indicó que el efecto del ambiente actuó sobre la expresión de algunos caracteres morfológicos, y que los alelos que están compartiendo las poblaciones son similares para pasilla y puya, probablemente debido al intercambio genético que puede existir con la movilidad de la semilla, ya que estos tipos de chile comparten la zona de producción.

3.4. CONCLUSIONES

En las accesiones de chile guajillo, pasilla y puya se identificó un nivel alto de polimorfismo y la presencia dentro de las accesiones de un elevado número de heterocigotos. Y la diversidad dentro de cada tipo de chile fue mayor que la detectada entre los tres tipos.

Existe similitud genética entre las accesiones de chile puya y algunas de chile pasilla, al igual que una similitud entre el chile pasilla y algunas poblaciones de guajillo.

El chile puya se encuentra más relacionado al chile pasilla que al guajillo.

3.5. AGRADECIMIENTOS

Al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, que brindó el financiamiento para esta investigación a través de la Red Nacional de Chile del SINAREFI.

3.6. REFERENCIAS

- Aguilar-Meléndez A, P L Morrell, M L Roose y Seung-Chul K (2009)** Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany* 96:1190-1202.
- Alvarez G M (2011)** La selección asistida por marcadores (MAS, Marker-assisted selection) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales* 32:154-171.
- Applied Biosystems (2006)** Genemapper v4. 0. Applied Biosystems Paisley, United Kingdom. <http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?query=genemapper&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=>
- Aranguren-Méndez J, R Román-Bravo, W Isea, Y Villasmil y J Jordana (2005)** Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos latinoamericanos de producción animal* 13(1):30-42.
- Azofeifa-Delgado Á (2006)** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-241.
- Barboza G E (2011)** Lectotypifications, synonymy, and a new name in *Capsicum* (Solanoideae, Solanaceae). *PhytoKeys*:23-38.
- Castañón-Nájera G, M Ramírez M, N Mayek-Pérez, A C García y R Ruíz-Salazar (2014)** Molecular comparison of wild and commercial chilies from Tamaulipas and Tabasco, Mexico. *Pakistan Journal of Botany* 46:2101-2106.
- Contreras T A R, S López H, V Santacruz A, M Valadez E, Aguilar-Rincón V H, T Corona T y López P A (2011)** Diversidad genética en México de variedades nativas de Chile poblano mediante microsatélites. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34:225-232.
- Frankel O H (1984)** Genetic perspectives of germplasm conservation. *In: Genetic manipulation: impact on man and society*. W Arber, K Illmensee, W J Peacock y P Starlinger (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp: 161-170.

- Hernández-Verdugo S, P Dávila-Aranda y K Oyama (1999)** Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 64:65-84.
- Hernández-Verdugo S, R G L España, P S Peña, M V Romero, S P Terraza, F Porras y J L C Madrid (2008)** Variación fenotípica entre y dentro de poblaciones silvestres de Chile del noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:323-330.
- Ibarra-Torres P, E Valadez-Moctezuma, M Pérez-Grajales, J Rodríguez-Campos y M E Jaramillo-Flores (2015)** Inter and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 181:137-146.
- Ibiza V P, J Blanca, J Cañizares y F Nuez (2012)** Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:1077-1088.
- Kaplinski L, R Andreson, T Puurand y M Remm (2004)** MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics Applications Note* 21:1701-1702.
- Kraft K H, C H Brown, G P Nabhan, E Luedeling, J J Luna R, G Coppens d'Eeckenbrugge, R J Hijmans y P Gepts (2014)** Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Science* 111:6165-6170.
- Laborde-Cancino J A y O Pozo-Campodónico (1982)** Presente y Pasado del Chile en México. Publicación especial INIA No. 85. México D. F. 80 p.
- Lee J M, S H Nahm, Y M Kim y B D Kim (2004)** Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108:619-627.
- Livera M M, P Ramírez V, F Castillo G, A Muratalla L y Y D Ortíz H. (2000)** Los Recursos Fitogenéticos en Perspectiva. In: Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura, Informe Nacional. P Ramírez V, R Ortega P, A López H, F Castillo G, M Livera M, F Rincón S y F Zavala G (eds). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C., Chapingo, México, pp: 169-188.
- Loaiza-Figueroa F, K Ritland, J A L Cancino y S Tanksley (1989)** Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 165:159-188.
- Minamiyama Y, M Tsuru y M Hirai (2006)** An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding* 18:157-169.
- Monteiro E, A Bronzato, G Orasmo, A Lopes, R Gomes, C Mangolin y M Machado (2013)** Genetic diversity analysis of *Capsicum* spp. germplasm bank accessions based on α/β -esterase polymorphism. *Genetics and Molecular Research* 12:1155-1167.

- Pacheco-Olvera A, S Hernández-Verdugo, V Rocha-Ramírez, A González-Rodríguez y K Oyama (2012)** Genetic Diversity and Structure of Pepper (L.) from Northwestern Mexico Analyzed by Microsatellite Markers. *Crop Science* 52:231-241.
- Pérez-Castañeda L M, G Castañón-Nájera, M Ramírez M y N Mayek-Pérez (2015)** Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 2:117-128.
- Piñero D, J Caballero-Mellado, D Cabrera-Toledo, C E Canteros, A Casas, S A Castañeda, A Castillo, R Cerritos, O Chassin-Noria, P Colunga-GarcíaMarín, P Delgado, P Díaz-Jaimes, L E Eguiarte, A E Escalante, B Espinoza, A Fleury, R S Flores, G Fragoso, J González-Astorga, V V Islas, E Martínez, F Martínez, J Martínez-Castillo, Y A Mastretta, R Medellín, L Medrano-González, F Molina-Freaner, V B Morales, V A Murguía, E Payró de la Cruz, M R Reyes-Montes, S M R Robles, G Rodríguez-Arellanes, B L Rojas, R Romero-Martínez, J H Sahaza-Cardona, S L R., E Sciutto, B C Scott, U Y Schramm, C Silva, V Souza, M L Taylor, R J Urbán, M Uribe-Alcocer, C M d J Vázquez, E Vázquez-Domínguez, P A Vovides, A Wegier, R A Zaldívar y G Zúñiga (2008)** La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *In: Capital natural de México. Vol I : Conocimiento actual de la biodiversidad. vol 15. CONABIO México. pp: 437-494.*
- Pla L E (1986).** Análisis Multivariado: Método de Componentes Principales. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D. C. 94 p.
- Pozo C O, S Montes y E Redondo (1991)** Chile (*Capsicum* spp.). *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México.* R Ortega Paczka, G Palomino Hasbach, F Castillo González, V A González Hernández and M Livera Muñoz (eds). Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C., Mexico, pp: 217-238.
- Rana M, R Sharma, P Sharma, S V Bhardwaj y M Sharma (2014)** Estimation of Genetic Diversity in *Capsicum annuum* L. Germplasm Using PCR-Based Molecular Markers. *National Academy Science Letters* 37:295-301.
- Rao V R y T Hodgkin (2002)** Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell, tissue and organ culture* 68:1-19.
- Rohlf F J (2000)** NTYSSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Santamaría R I, M D Reyes-Duarte, E Bárzana, D Fernando, F M Gama, M Mota y A López-Munguía (2000)** Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3063-3067.
- SAS Institute (2011).** SAS User's Guide: Statistics. Version 9.3. Statistic Analysis System Institute. Cary, North Carolina, USA. 1032 p.

- Stágel A, I Gyurján, Z Sasvári, S Lanteri, M Ganal e I Nagy (2009)** Patterns of molecular evolution of microsatellite loci in pepper (*Capsicum* spp.) revealed by allele sequencing. *Plant Systematics and Evolution* 281:251-254.
- Tautz D y M Renz (1984)** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12:4127-4138.
- Thul S T, M P Darokar, A K Shasany y S P Khanuja (2012)** Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. *Mol Biotechnol* 51:137-147.
- Ved P R, K Rajesh, K Sanjay, R Ashutosh, K Sanjeet, S Major, S Pratap S, A Bahadur R y P Rajneesh (2013)** Genetic diversity in *Capsicum* germplasm based on microsatellite and random amplified microsatellite polymorphism markers. *Physiology Molecular Biology of Plants* 19:575-586.
- Votava E J, J B Baral y P W Bosland (2005)** Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany* 59:8-17.
- Votava E, G Nabhan y P Bosland (2002)** Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an *in situ* population and *ex situ* accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conservation Genetics* 3:123-129.
- Wall M M, C A Waddell y P W Bosland (2001)** Variation in b-carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *HortScience* 36:746-749.
- Wright S (1978)** Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. Vol. 4. University of Chicago press, Chicago, IL, USA. 580 p.
- Yeh F, R Yang y T Boyle (1999)** Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis (Release 1.31). Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Yumnam S J, W Tyagi, A Pandey, N M Tombisana y M Rai (2012)** Evaluation of Genetic Diversity of Chilli Landraces from North Eastern India Based on Morphology, SSR Markers and the Pun1 Locus. *Plant Mol Biol Rep* 30:1470-1479.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES GENERALES

Con la caracterización molecular y bioquímica del presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones generales:

Existe una amplia variación genética entre y dentro de las poblaciones de los tres tipos de chile, siendo mayor la variación dentro de las poblaciones.

En general las diversas poblaciones se agruparon de acuerdo al tipo de chile, aunque algunas poblaciones de chile pasilla de Zacatecas y Michoacán se agruparon con los chiles guajillo, al igual que algunas poblaciones de Guanajuato, San Luis Potosí, Aguascalientes y Jalisco se agruparon con los chiles tipo puya.

Genéticamente existe una mayor relación entre los chiles puya y pasilla que la que puede existir con guajillo.

Bioquímicamente hay mayor concentración de carotenoides y flavonoides en los chiles tipo pasilla, y de capsaicinoides en el tipo puya.

Bajo las condiciones de cultivo en el estado de San Luis Potosí hay una mayor producción de capsaicinoides y carotenoides, y en las condiciones de Zacatecas mayor producción de flavonoides.