



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**RADIACIÓN GAMMA Y MANEJO NUTRIMENTAL EN LA  
PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL CHILE CHILHUACLE  
(*Capsicum annum* L. Solanaceae)**

**VÍCTOR GARCÍA GAYTÁN**

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

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2018


**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe VÍCTOR GARCÍA GAYTÁN, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Fernando C. Gómez Merino, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

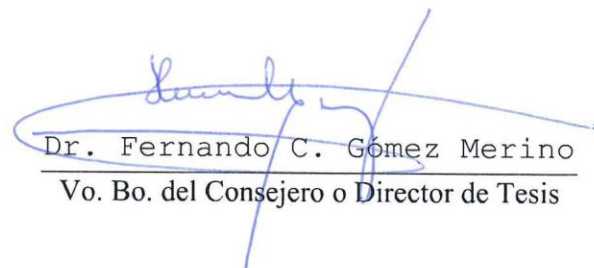
Radiación gamma y manejo nutrimental en la producción y calidad del chile chilhuacle (Capsicum annum L. Solanaceae)

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 22 de diciembre de 2017



Firma del  
Alumno (a)



Dr. Fernando C. Gómez Merino  
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **Radiación gamma y manejo nutrimental en la producción y calidad del chile chilhuacle (*Capsicum annuum* L.; Solanaceae)**, realizada por el alumno **Víctor García Gaytán**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

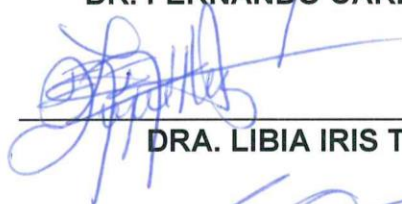
**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN EDAFOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:

  
\_\_\_\_\_  
**DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ-MERINO**

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ**

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JULIÁN DELGADILLO-MARTÍNEZ**

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. SOLEDAD GARCÍA-MORALES**

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. OLGA TEJEDA-SARTORIUS**

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. MARIBEL RAMÍREZ-MARTÍNEZ**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero 2018

# **RADIACIÓN GAMMA Y MANEJO NUTRIMENTAL EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL CHILE CHILHUACLE (*Capsicum annuum* L. Solanaceae)**

Víctor García Gaytán, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2018

## **RESUMEN**

Existen factores adversos como sequía, calor, frío, infecciones por patógenos, que tiene un impacto negativo sobre el rendimiento de los cultivos a nivel mundial. Por tanto, el potencial de rendimiento debe incrementarse frente a estos problemas. El mejoramiento de los cultivos sigue siendo una necesidad importante, puesto que aún no hemos sido capaces de satisfacer la demanda de alimentos a nivel mundial. La radiación gamma es un método eficaz para inducir mutagénesis en los organismos vivos y se emplea para el mejoramiento genético de plantas. El objetivo del presente investigación fue evaluar diferentes dosis de rayos gamma (RG) en semillas de chile chilhuacle, así como analizar las respuestas fisiológicas, la producción y calidad de frutos en plantas regadas con solución nutritiva bajo diferentes niveles de potencial osmótico (PO) en condiciones de invernadero; además de identificar los polimorfismos de los posibles mutantes por RG con el uso de marcadores moleculares RAPD. Primero se evaluaron los parámetros fisiológicos en plántulas por el efecto de siete dosis de radiación gamma (RG) (0, 10, 20, 40, 80, 120 y 160 Gy), en otro experimento fueron seleccionados tres dosis de RG (0, 10, 80 y 120 Gy) y las plantas fueron adaptadas a diferentes potenciales osmóticos (PO) (-0.036, -0.072, -0.092 y -0.108 MPa) de la solución nutritiva en hidroponía. Las dosis de radiación gamma tuvieron efectos significativos en las lecturas SPAD, altura de planta, diámetro de tallo y volumen radical. Con 80 y 120 Gy hubo incrementos de aminoácidos y azúcares en hojas y frutos. Con la RG de 10 Gy y el PO de -0.072 y -0.092 MPa se obtuvieron los valores más altos en las variables de rendimiento. Dos plantas mutantes de fruto con pericarpio de color rojo se obtuvieron con 10 y 120 Gy, inicialmente la irradiación de semillas fueron provenientes de frutos negros. Un total de 57 fragmentos de PCR se amplificaron, 12 fragmentos revelaron polimorfismo con promedio de 2.4 bandas polimórficas por primers. Los resultados mostraron evidencias de que el uso de la RG es un método potencialmente eficaz para inducir variación en chile chilhuacle. Los cambios genotípicos en los mutantes se expresan fenotípicamente como mayor incremento en el número de frutos por planta en el PO de -0.072 y -0.092 MPa respectivamente.

**Palabras clave:** chile chilhuacle, radiación gamma, potencial osmótico, polimorfismos, fragmentos, seguridad alimentaria

# **GAMMA RADIATION AND NUTRIMENTAL MANAGEMENT IN THE PRODUCTION AND QUALITY OF CHILE CHILHUACLE (*Capsicum annuum* L. Solanaceae)**

Víctor García Gaytán, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2017

## **ABSTRACT**

There are adverse factors such as drought, heat, cold, infections by pathogens, which has a negative impact on crop yield worldwide. Therefore, the performance potential must increase in the face of these problems. The improvement of crops continues to be an important need, since we have not yet been able to meet the demand for food worldwide. Gamma radiation is an effective method to induce mutagenesis in living organisms and is used for the genetic improvement of plants. The objective of the present investigation was to evaluate different doses of gamma rays (GR) in chilhuacle chili seeds, as well as to analyze the physiological responses, production and quality of fruits in plants irrigated with nutrient solution under different levels of osmotic potential (OP) in greenhouse conditions; besides identifying the polymorphisms of the possible mutants by RG with the use of RAPD molecular markers. First the physiological parameters in seedlings were evaluated by the effect of seven doses of gamma radiation (GR) (0, 10, 20, 40, 80, 120 and 160 Gy), in another experiment three doses of GR were selected (0, 10, 80 and 120 Gy) and the plants were adapted to different osmotic potentials (OP) (– 0.036, – 0.072, – 0.092 and – 0.108 MPa) of the nutrient solution in hydroponics. Gamma radiation doses had significant effects on SPAD readings, plant height, stem diameter and root volume. With 80 and 120 Gy there were increases of amino acids and sugars in leaves and fruits. With the RG of 10 Gy and the OP of – 0.072 and – 0.092 MPa, the highest values were obtained in the performance variables. Two fruit mutant plants with red pericarp were obtained with 10 and 120 Gy, initially the irradiation of seeds were from black fruits. A total of 57 PCR fragments were amplified, 12 fragments revealed polymorphism with an average of 2.4 polymorphic bands per primers. The results showed evidence that the use of GR is a potentially effective method to induce variation in chili chilhuacle. The genotypic changes in the mutants are phenotypically expressed as a greater increase in the number of fruits per plant in the OP of – 0.072 and – 0.092 MPa respectively.

**Keywords:** chili chilhuacle, gamma radiation, osmotic potential, polymorphisms, fragments, food security

**DEDICO ESTE TRABAJO**

A mis hijos:

**Víctor García Hernández y Alberto García Hernández**  
quienes son el motor para esforzarme y seguir adelante.

A mi querida esposa **Fanny Hernández Mendoza** quien me ha  
apoyado en todo momento.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** quien me otorgo la beca para mis estudios de postgrado

Al **Colegio de Postgraduados** por facilitarme la oportunidad de concluir mis estudios de doctorado, a todos los profesores que me compartieron sus conocimientos y que me ayudaron en mi vida profesional.

A mis profesores quienes guiaron esta investigación:

**Dr. Fernando Gómez Merino:** Por su visión, apoyo, dirección y aporte durante toda la fase de investigación

**Dra. Libia I. Trejo-Téllez:** Por su apoyo en el análisis de laboratorio, dirección en toda la fase de investigación

**Dr. Julián Delgadillo Martínez:** Por su apoyo en la calidad y revisión de esta investigación.

**Dra. Soledad García Morales:** Por su enseñanza en la fase de laboratorio

**Dra. Olga Tejeda Sartorius:** Por la aportación en la tesis y revisión

**Dra. Maribel Ramírez Martínez:** Por la aportación en la tesis y revisión

**Dra. Ernestina Valadez Moctezuma:** Por su enseñanza en la fase de laboratorio

Al Personal del Laboratorio de Nutrición Vegetal “Salvador Alcalde Blanco” y administrativo:

**A Don Roberto, Don Wences, Juan Manuel, Laurita**

A mis Compañeros durante el Doctorado:

**Héctor, Peter, Sarita, Gloria, Víctor Hugo, Hugo Fernando, Lupita, Emmanuel, Elías, Nadia, Brenda, Cesar, Vicky, Juan, Azarael, Lucio, Karla y José**

A mis Padres: **Juana Gaytán Vázquez y Pedro García Gaytán**

A mis hermanos: **Eloy, Alicia, Paula, Angelina y Patricia**

A la Universidad de Georgia durante mi estancia:

**Al Dr. Juan Carlos Díaz Pérez, Jesús Bautista, Ing. Carmelo, Hadis, Zahra Gunawati Gunawan, Anthony Bateman, Armando**

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO II. THE CHILHUACLE CHILI (<i>Capsicum annum</i> L.) IN MEXICO: DESCRIPTION OF THE VARIETY, ITS CULTIVATION, AND USES</b> .....	<b>11</b>
Abstract .....	12
2.1. INTRODUCTION .....	12
2.2. Culinary uses of chilhuacle chili by indigenous people .....	15
2.3. Main topics addressed in the literature on chilhuacle chili .....	16
2.4. Origin, taxonomy, and botany of chilhuacle chili .....	17
2.5 Agronomic practices for chilhuacle chili production .....	22
2.5.1. Seedling production .....	23
2.5.2. Chilhuacle chili nutrient management .....	25
2.5.3. Pests and diseases.....	28
2.5.4. Fruit dehydration.....	28
2.6. Chilhuacle chili may be more than a spicy culinary fruit.....	29
2.7. Conclusions and perspective .....	31
2.8 LITERATURE CITED.....	33
<b>CAPÍTULO III. CRECIMIENTO, CONCENTRACIÓN DE NUTRIMENTOS Y CLOROFILAS EN PLÁNTULAS DE CHILE CHILHUACLE EN RESPUESTA A LA RADIACIÓN GAMMA Y EL TIPO DE SUSTRATO</b> .....	<b>44</b>



RESUMEN.....	44
3.1. INTRODUCCIÓN.....	45
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
3.2.1. Material biológico.....	47
3.2.2. Radiación de semillas.....	47
3.2.3. Sustratos .....	47
3.2.4. Proceso de germinación .....	47
3.2.5. Variables evaluadas .....	48
3.2.5.1. Densidad aparente (DA), densidad real (DR) y porosidad total (PT) ...	48
3.2.5.2. pH y conductividad eléctrica (CE).....	48
3.2.5.3. Iones solubles.....	48
3.2.5.4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC) .....	48
3.2.5.5. Lecturas SPAD y parámetros de crecimiento .....	48
3.2.6. Análisis de nutrientes minerales y contenido de clorofila.....	49
3.2.7. Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico .....	50
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
3.3.1. Densidad aparente (DA), densidad real (DR) y porosidad total (PT).....	50
3.3.2. pH y conductividad eléctrica (CE).....	51
3.3.3. Iones solubles.....	51
3.3.4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC) .....	52
3.3.5. Radiación gamma en variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	54
3.3.6. Efecto del sustrato en variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	56
3.3.7. Análisis de nutrientes minerales y contenido de clorofila.....	61
3.4. CONCLUSIONES.....	67

3.5. LITERATURA CITADA .....	68
<b>CAPÍTULO IV. FIRST REPORT OF POWDERY MILDEW IN CHILHUACLE CHILI (<i>Capsicum annuum</i>) CAUSED BY <i>Leveillula taurica</i> IN SOUTHERN MEXICO ...</b>	<b>75</b>
4.1. DISEASE NOTES.....	75
4.2. LITERATURE CITED.....	76
<b>CAPÍTULO V. GAMMA RADIATION AND OSMOTIC POTENTIAL OF THE NUTRIENT SOLUTION DIFFERENTIALLY AFFECT MACRONUTRIENT CONCENTRATIONS, pH AND EC IN CHILHUACLE PEPPER FRUIT .....</b>	<b>78</b>
Abstract .....	78
5.1. INTRODUCTION .....	79
5.2. MATERIALS AND METHODS.....	80
5.2.1. Conditions of the experiment .....	80
5.2.2. Plant material.....	81
5.2.3. Seed irradiation.....	81
5.2.4. Seed germination and transplantation of plantlets.....	81
5.2.5. Treatments and experiment desing.....	82
5.2.6. Evaluated variables .....	82
5.2.6.1. Macronutrient concentration in fruits.....	82
5.2.6.2. Fruit pulp pH and EC .....	83
5.2.7. Statistical analysis .....	84
5.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	84
5.3.1. Macronutrient concentration in fruits.....	84
5.3.2. pH and EC in fruit pulp.....	97
5.4. CONCLUSIONS.....	101

5.5. LITERATURE CITED.....	102
----------------------------	-----

**CAPÍTULO VI. PRODUCCIÓN DE MUTANTES EN CHILE CHILHUACLE: CAMBIOS BROMATOLÓGICOS EN LA GENERACIÓN M<sub>1</sub> Y POLIMORFISMO EN LA GENERACIÓN M<sub>2</sub>.....111**

Resumen .....	111
6.1. INTRODUCCIÓN.....	112
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	115
6.2.1. Irradiación de semillas .....	115
6.2.2. Condiciones del experimento, germinación y trasplante.....	115
6.2.3. Valores del análisis físico y químico del sustrato.....	116
6.2.4. Potencial osmótico y solución nutritiva.....	117
6.2.5. Generación M <sub>1</sub> :.....	117
6.2.5.1. Parámetros de rendimiento.....	117
6.2.5.2. Clofilas <i>a</i> y <i>b</i> y aminoácidos libres totales .....	117
6.2.5.3. Cuantificación de azúcares solubles totales y sólidos solubles totales .....	118
6.2.5.4. Concentración de micronutrientos en tallo, ramas, hojas y frutos...	118
6.2.5.5. Tratamiento y diseño experimental en la generación M <sub>1</sub> .....	119
6.2.6. Generación M <sub>2</sub> :.....	119
6.2.6.1. Extracción de ADN .....	120
6.2.6.2. Amplificación de RAPD.....	120
6.2.6.3. Separación de productos amplificados .....	120
6.2.6.4. Análisis molecular en la generación M <sub>2</sub> .....	121
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	122

6.3.1. Generación M <sub>1</sub> .....	122
6.3.1.1. Parámetros de rendimiento.....	122
6.3.1.2. Clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> y aminoácidos libres totales .....	129
6.3.1.3. Cuantificación de azúcares solubles totales y sólidos solubles totales .....	132
6.3.1.4. Concentración de micronutrientos en tallo, ramas, hojas y frutos...	136
6.3.2. Generación M <sub>2</sub> .....	149
6.3.2.1. Análisis de RAPD y relación genética.....	149
6.4. CONCLUSIÓN.....	153
6.5. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	154

## LISTA DE CUADROS

### CAPÍTULO II

	Pág.
Cuadro 1 Chilhuacle chili developmental stages and color changes from immature to mature fruits.....	21
Cuadro 2 Capsaicin and capsaicinoid concentrations and pungency of different chilies native to Mexico.....	30

### CAPÍTULO III

Cuadro 1 Porosidad total, densidad aparente y densidad real de los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle ( <i>C. annuum</i> L.).....	51
Cuadro 2 Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) en los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle.....	51
Cuadro 3 Concentración de nutrientes en el extracto de la pasta de saturación en los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle.....	52
Cuadro 4 Cationes intercambiables y capacidad de intercambio catiónico (CIC) en los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle.....	52
Cuadro 5 Efecto de los factores de estudio dosis de radiación, sustrato y su interacción en cada una de las variables evaluadas.....	53
Cuadro 6 Efecto del nivel de radiación sobre variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	54
Cuadro 7 Efecto del nivel de radiación sobre variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	56
Cuadro 8 Efecto del tipo de sustrato sobre variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	57
Cuadro 9 Efecto principal del sustrato en variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	58

Cuadro 10	Efecto de la interacción RG x sustrato sobre las variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	59
Cuadro 11	Efecto de la interacción RG x sustrato sobre las variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.....	60
Cuadro 12	Concentración macronutrientes en hojas de plántulas de chile chilhuacle por efecto de irradiación gamma.....	61
Cuadro 13	Concentración de macronutrientes en hojas de plántulas de chile chilhuacle por efecto del tipo de sustrato.....	62
Cuadro 14	Efecto de la interacción RG x sustrato en la concentración de macronutrientes ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en tejido foliar en plántulas de chile chilhuacle.....	64
Cuadro 15	Efecto de la interacción RG x sustrato en contenido de clorofilas a y b en plántulas de chile chilhuacle.....	67

#### **CAPÍTULO V.**

Cuadro 1	Concentration of N, P, K, Ca and Mg ( $\text{g kg}^{-1}$ dry matter) in chilhuacle pepper fruits at 70, 90, and 130 dat in response to main effects of the study factors: GR (Gy) and OP (MPa).....	86
Cuadro 2	N, P, K, Ca and Mg concentrations ( $\text{g kg}^{-1}$ dry matter) in chilhuacle pepper ( <i>Capsicum annuum</i> ) fruits at 70 dat in response to the effect of the interaction between gamma radiation (Gy) doses and osmotic potential of the nutrient solution (OP; MPa).....	91
Cuadro 3	N, P, K, Ca and Mg concentrations ( $\text{g kg}^{-1}$ dry matter) in chilhuacle pepper ( <i>Capsicum annuum</i> ) fruits at 90 dat from the effect of the interaction between gamma radiation (Gy) doses and osmotic potential of the nutrient solution (OP MPa).....	92
Cuadro 4	N, P, K, Ca and Mg concentrations ( $\text{g kg}^{-1}$ dry matter) in chilhuacle pepper ( <i>Capsicum annuum</i> ) fruits at 130 dat from the effect of the interaction between gamma radiation (Gy)	

doses and osmotic potential of the nutrient solution (OP MPa).....	93
--	----

## CAPÍTULO VI.

Cuadro 1	Efecto individual de los factores RG y PO en las variables número total de frutos, peso de biomasa fresca de frutos, peso de biomasa seca de frutos, ancho de frutos, longitud del fruto.....	122
Cuadro 2	Efecto de la interacción RG y potencial osmótico de la solución nutritiva sobre el número total de frutos, peso de biomasa fresca, peso de biomasa seca, ancho y longitud de frutos de chile chilhuacle.....	124
Cuadro 3	Interacción de las dosis RG y PO sobre el contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , aminoácidos libres, azúcares totales solubles y sólidos solubles totales en chile chilhuacle.....	135
Cuadro 4	Interacción de las dosis RG y PO sobre la concentración de Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ de PBS) en el tallo, ramas, hojas y frutos del chile chilhuacle.....	139
Cuadro 5	Interacción de las dosis RG y PO sobre la concentración de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ PSB) en el tallo, ramas, hojas y frutos del chile chilhuacle.....	147
Cuadro 6	Interacción entre la dosis de RG y el PO en la concentración de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ PSB) en el tallo, ramas, hojas y frutos del chile chilhuacle.....	148
Cuadro 7	Características de los cebadores RAPD y perfil de huella dactilar de ADN utilizados en el análisis de mutantes de chile chilhuacle en la generación $M_2$ .....	149
Cuadro 8	Matriz de similitud de Jaccard entre los mutantes de chile chilhuacle en la generación $M_2$ , generada a partir de los datos de los marcadores RAPD.....	150

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

	Pág.
Figure 1 Summary of chilhuacle chili production, yield, and potential uses.....	14
Figure 2 Cañada Region in the State of Oaxaca, Mexico, the only place in the word where chilhuacle chili is produced. Cañada Region is located within the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve in southeast Mexico, within the State of Puebla and Oaxaca.....	18
Figure 3 Morphology of a mature chilhuacle chili plant and anatomy of fruits. (1) A chilhuacle plant during fruit development. (2) A mature fruit. (3) A stigma. (A) Stamens. (5) Petals. (5) Petals. (6) Flowers. (7) Leaves. (8) Cross section of immature fruit showing septum and seeds. (9) Immature seed of the fruit. (10) Mature seeds are yellow.....	19
Figure 4 Flower developmental stages of chilhuacle chili. (A) Floral bud 1 day after pollination (DAP). (B) 2 DAP. (C) 4 DAP. (D) 5 DAP. (E) 7 DAP. (F) Fruit development 8 DAP.....	20
Figure 5 Development of the chilhuacle chili fruit. The fruit develops 7 days after pollination (DAP). At the beginning of fruit development, the calyx covers a substancial portion of the outside of the fruit (15 DAP). Subsequently, the fruit acquires an elongated form, with a thick peduncle (20 to 27 DAP). When the fruit has achieved its final size and shape, the color is black or very deep purple and the calyx is immersed in the fruit (42 to 54 DAP). Developed fruits can be harvested between 60 and 78 DAP.....	20
Figure 6 Color change from immature to mature fruits of chilhuacle chili: (1) Immature fruit. (2) Green fruit. (3) Green mature fruit. (4) Mature fruit.....	21



Figure 7	Dehydrated fruit of chilhuacle chili. (A) A mature chilhuacle fruit 78 DAP. (B) A dehydrated fruit. (C) A dehydrated fruit, showing the apex, which consists of a thick pericarp and placental tissue to which the seeds are attached. (D) In mature dehydrated fruits, the seed are flattened and yellow in color.....	22
Figure 8	Characteristic chilhuacle chili seedlings and their root ball in three different substrates 50 day after planting. (A) Seedling developed in peat. (B) Seedling developed in common soil. (C) Seedling development in volcanic gravel. Plant were irrigated every other day with 25% Steiner´s nutrient solution.....	25

### CAPÍTULO III.

Figura 1	Cambios en el contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> en plántulas de chile chilhuacle después de la irradiación gamma en semillas. Medias $\pm$ SD de tres replicas en la extracción, letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\leq$ 0.05).....	65
Figura 2	Cambios en el contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> en plántulas de chile chilhuacle por efecto de tipo de sustrato empleado peat, tezontle y suelo. Todos los valores son Medias $\pm$ SD de tres replicas en la extracción. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\leq$ 0.05).....	66

### CAPÍTULO V.

Figure 1	Variation in color o chilhuacle fruits according to maturation stages determined based on the Royal Horticultural Society color chart (Chart RC, 2015).....	83
Figure 2	Schematic diagram of the influence of gamma radiation and osmotic potential on plant nutrition and fruit quality. <b>A</b> Dual (positive and negative) effects of gamma radiation on plants.	

**B** Gamma radiation with  $^{60}\text{Co}$  on seeds and its possible direct effects on the DNA double helix and indirect effects through radiolysis of cell with the water. ROS also occur in various metabolic pathways located in various cellular compartments such as chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. Activation of both enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems may counteract ROS boots..... 96

Figura 3 Effect of gamma radiation and osmotic potential on the pH of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. **A** pH values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of gamma radiation doses to seeds. **B** pH values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of the osmotic potential of the nutrient solution. Means  $\pm$  SD with distinct letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05)..... 97

Figure 4 Effect of the interaction of study factors: gamma radiation on seeds and osmotic potential of the nutrient solution on the pH of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. Means  $\pm$  SD with distinct letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05)..... 99

Figure 5 Effect of gamma radiation and osmotic potential on the electrical conductivity (EC) of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. **A** EC values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of gamma radiation on seeds. **B** EC values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of osmotic potential of the nutrient solution. Means  $\pm$  SD with different letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05)..... 100

Figure 6 Effect of the interaction of the study factors, that is, gamma radiation doses on seeds and osmotic potential of the nutrient solution, on the EC of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*)

fruits. Means  $\pm$  SD with distinct letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05)..... 101

## CAPÍTULO VI

- Figura 1 Frutos de la generación M<sub>1</sub>, a partir de semillas irradiadas con el isótopo Co<sup>60</sup> y sometidas a cuatro potenciales osmóticos de la solución nutritiva (-0,036 MPa, -0,072 MPa, -0,092 MPa y -0,108 MPa). (A) Frutos de chile silvestre de color negro (WB); (B) Características de los frutos sometidas con 10 Gy (M10); (C) Características de los frutos sometidos con 80 Gy (M80); (D) Características de los frutos sometidos con 120 Gy (M120) y (E) frutos rojos silvestres (WR) y mutantes con frutos rojos generados a partir de tratamientos con 10 Gy (M10) y 120 Gy (M120) y con potenciales osmóticos de -0,036 MPa..... 127
- Figura 2 Efecto de los RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de clorofilas, aminoácidos, azúcares y sólidos solubles totales de frutos de chile chilhuacle. (Fig. 2A y B) Contenido de clorofila a y b. (Fig. 2C y D) Contenido de aminoácidos libres totales. (Fig. 2E y F) Azúcares solubles totales y (Fig. 2G y H) Sólidos solubles totales. Diferentes letras arriba de la columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $P \leq 0,05$ ). PBF = peso de biomasa fresca..... 131
- Figura 3 Efecto de las dosis RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de Fe en diferentes órganos del chile chilhuacle. (Fig. 3a y b) Tallo. (Fig. 3c y d) Ramas. (Fig. 3e y f) Hojas y (Fig. 3g y h) frutos. Diferentes letras por encima de la columna indican diferencias significativas (Tukey,  $\leq 0,05$ ). PBF: peso de biomasa seca..... 137

Figura 4	Efecto de las dosis de RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de Cu en diferentes órganos del chile. (Fig. 4 a y b) Tallo. (Fig. 4 c y d) Ramas. (Fig. 4 e y f) Hojas y (Fig. 4 g y h) frutos. Diferentes letras por encima de la columna indican diferencias significativas (Tukey, $\leq 0,05$ ). PSB = peso de biomasa seca.....	143
Figura 5	Efecto de las dosis RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de Zn en diferentes órganos del chile. (Fig. 5a y b) Tallo. (Fig. 5 c y d) Ramas. (Fig. 5 e y f) Hojas y (Fig. 5 g y h) frutos. Diferentes letras por encima de la columna indican diferencias significativas (Tukey, $\leq 0,05$ ). PSB = peso de biomasa seca.....	145
Figura 6	Dendrograma basado en UPGMA de los perfiles RAPDs en la generación M <sub>2</sub> de chile chilhuacle.....	150
Figura 7	Análisis de coordenadas principales (PCoA) del conjunto de datos RAPD en la generación de chile chilhuacle M <sub>2</sub> .....	151

# CAPÍTULO I

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El aumento de la población y el consumo de alimentos están generando demandas sin precedentes sobre la agricultura y los recursos naturales. Alrededor de mil millones de persona sufren de desnutrición crónica, mientras que nuestros sistemas agrícolas de producción están degradando simultáneamente la tierra, el agua, la biodiversidad y el clima a escala mundial (Foley *et al.*, 2011). Los fitomejoradores deben centrar su esfuerzo en los rasgos con mayor potencial, para incrementar la producción de alimentos de alta calidad (Tester y Langridge, 2010). Hoy en día, se necesitan inversiones para mejorar la seguridad alimentaria en el futuro, reducir la huella energética en los sistemas alimentarios, desarrollar y adoptar variedades resistentes al cambio climático, modernizar la infraestructura de riego, reforzar los suministros de alimentos nacionales así como el comercio internacional de alimentos y responder a las necesidades de los países en desarrollo (Hanjra y Qureshi, 2010). El cambio climático tiene un impacto devastador sobre la biodiversidad, esto significa que tomar medidas para conservar la diversidad de los cultivos silvestres ya no es una opción, sino una prioridad urgente (Vincent *et al.*, 2013). Los parientes silvestres de los cultivos domesticados poseen diversidad genética útil para desarrollar variedades más productivas, nutritivas y resistentes (Castañeda-Álvarez *et al.*, 2016). En ese sentido, nuestro estudio se centra en el chile chilhuacle una especie endémica de la Región Cañada del estado de Oaxaca, México. El fruto deshidratado se utiliza como condimento principal en la elaboración del mole negro oaxaqueño, un platillo típico de la comida mexicana y que es reconocida en la gastronomía internacional. El chilhuacle se cultiva de forma tradicional, tiene bajos rendimientos, los paquetes tecnológicos de este cultivo son nulos, tiene una alta incidencia de plagas y enfermedades que obstaculizan su producción, además su variabilidad genética está restringida (García-Gaytán *et al.*, 2016; García-Gaytán *et al.*, 2017).

El chile es el octavo cultivo con mayor valor generado en la agricultura nacional, alcanzando alrededor de 13 mil mdp anualmente, con un volumen de producción promedio de 2.2 millones de toneladas, del cual se exportan cerca de 900 mil toneladas de chiles frescos, secos y sus derivados (SAGARPA, 2015). El mole negro oaxaqueño

y el chile chilhuacle tienen altos valores nutricionales y gastronómicos que justifican cualquier iniciativa innovadora emprendida para mejorar el conocimiento de su cultivo y uso. Frente a estos desafíos y oportunidades, las líneas de investigación, desarrollo tecnológico e innovación que se pueden generar comprenden desde estudios básicos sobre variabilidad genómica, bioquímica y fisiología de los cultivos hasta temas relacionados con su uso y posibles aplicaciones ([García-Gaytán et al., 2017](#)).

Es indispensable recurrir al uso de la innovación para incrementar la producción de chiles a nivel nacional, fundamentado por el hecho de que solo a base de nuevas tecnologías se puede garantizar un crecimiento sostenido de la producción y rendir utilidades a los agricultores. El proceso de transferencia de tecnología no es sencillo, pues se requiere del diseño e implementación de estrategias para que la información llegue oportuna y adecuadamente a los receptores, y que ésta responda a sus necesidades de información ([Galindo et al., 2002](#)). Si bien, la variabilidad genética es el verdadero potencial evolutivo de las especies, dado que a mayor variación más escenarios adaptativos, así la diversidad genética, entendida como las diferentes formas de un gen dentro de una población (alelos), constituye el material sobre el que actúa la evolución ([Octavio-Aguilar et al., 2013](#)). En este proceso evolutivo es posible que intervengan diversos factores que originan la variación, como la radiación ionizante, que en forma de radiación gamma, puede tener aplicación útil en la agricultura ([De Micco et al., 2011](#)). Con la irradiación de semillas se han identificado genotipos agrónomicamente deseables en su capacidad de floración, madurez temprana, color de flores y semillas, y rendimiento ([Horn et al., 2016](#)). En *Capsicum annuum* y *C. frutescens* la irradiación con neutrones rápidos (FNI) favoreció diferentes parámetros de rendimiento: En *C. annuum* fueron mejorados el número de frutos por planta, número de semillas por fruto, el ancho, longitud y peso del fruto. En tanto que *C. frutescens* mostró una reducción en la longitud y peso de frutos ([Falusi et al., 2012](#)).

Las mutaciones inducidas han tenido un impacto positivo, generando mayor absorción de iones específicos, mayor capacidad de exploración de las raíces, resistencia a las enfermedades y tolerancia a la sequía y salinidad ([Ahloowalia et al., 2004](#)). De acuerdo con la base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, y la Agencia Internacional de Energía Atómica

(FAO/IAEA) existen 3222 mutantes con características mejoradas que han sido liberados oficialmente (IAEA, 2015). Trabajos en campo evaluaron la sensibilidad de *Triticum aestivum* L. y *Vigna radiata* L. a diferentes niveles de radiación UV-B, la radiación provocó una disminución en los pigmentos fotosintéticos y biomasa, activación de los sistemas antioxidantes, sin embargo, con la aplicación de N, P, K, se indujo una reducción del efecto negativo de la radiación UV (Agrawal y Rathore, 2007). En *V. radiata* observaron que la fijación y asimilación de nitrógeno se vieron negativamente afectadas por la UV-B, debido a una disminución en la actividad nitrogenasa, nitrato reductasa y nitrito reductasa (Choudhary y Agrawal, 2014). En soja la concentración de hierro, cobre y zinc fueron incrementados por la dosis de radiación (Alikamanoglu *et al.*, 2011). La RG indujo incremento de K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y Mn, en plántulas de *Brassica campestris* (Yoon *et al.*, 1999). No existen estudios claros que demuestren el efecto de la radiación gamma sobre la concentración de nutrientes en plantas, mediante una nutrición controlada. Recientemente se ha investigado que la adaptación a la salinidad, inducida por RG, puede estar relacionada con un control multigénico, con participación activa y regulación favorable de las relaciones hídricas, expresión de enzimas (SOD, CAT y POX), baja peroxidación lipídica, reducción de la degradación proteica y acumulación inducida de osmolitos (Kumar *et al.*, 2016).

En esta investigación fueron irradiadas semillas del chile chilhuacle y evaluadas a diferentes potenciales osmóticos de la solución nutritiva. De acuerdo con Trejo-Téllez y Gómez-Merino (2012) la cantidad total de iones de sales disueltas en la solución de nutrientes ejercen una fuerza llamada presión osmótica o potencial osmótico que es una propiedad coligativa de las soluciones de nutrientes y que es dependiente de los solutos disueltos. Se ha demostrado que con PO de  $-0.073$  MPa se obtienen plántulas de *Cucumis melo* L. con mayor crecimiento vegetativo, mayor concentración y extracción nutrimental (Preciado-Rangel *et al.*, 2003). En *Cucumis sativus* L. los valores más altos obtenidos en las variables de crecimiento como la altura de planta, peso fresco y seco de vástago, fueron obtenidos con PO de  $-0.072$  MPa (Parra-Terraza *et al.*, 2004). En *Rhynchosia minima* L. una disminución en el PO de la solución nutritiva afectó la velocidad de germinación, inhibió el crecimiento del vástago a partir de  $-1.293$  MPa y el de raíz a partir de  $-0.862$  MPa (Madueño-Molina *et al.*, 2006). En



plántulas de tomate con un PO de  $-0.112$  MPa se incrementó la concentración de N (11.53%) y P (33.33%) en raíz, en tallo el P se incrementó (42.85%) respectivamente (Villegas-Torres *et al.*, 2005). Una práctica común para lograr los sólidos soluble en los frutos por ejemplo, de tomate, es incrementar la concentración de iones en la solución de nutrientes, de esta manera disminuye el potencial osmótico, esta práctica limita el flujo de agua en la fruta y por tanto, mejora el sabor en la fruta, una desventaja de incrementar los SST mediante la CE es la reducción del rendimiento, que se ve traducido en un menor peso de fruto y menor frutos durante la cosecha (Adams, 1991; Buck *et al.*, 2008; Wu y Kubota, 2008).

En nuestro trabajo de investigación está integrada por VI capítulos. En el primer capítulo es la introducción general. En el segundo capítulo de esta investigación se describen los aspectos técnicos del chile chilhuacle, como variedad nativa de la región Cañada del estado de Oaxaca y cuya producción ha sido muy valiosa por ser el componente principal en la elaboración del mole negro oaxaqueño. Se destacan las restricciones agronómicas asociadas con el proceso de producción, las plagas y enfermedades que presenta, así como temas que deben de ser abordados para su explotación sostenible. En el tercer capítulo se aborda el estudio del efecto de la dosis de radiación gamma en semillas y su germinación en diferentes tipos de sustratos sobre parámetros de crecimiento, concentración de nutrimental en hojas y contenido de clorofilas en hoja, se destaca que la GR incrementa de forma significativa las lecturas SPAD, altura de plántula, diámetro de tallo y volumen radical, la altura de plántula se incrementó en un 13.08% y 13.73% cuando se usó peat moss, sólo la concentración de N en hoja fue estimulado cuando se usó la dosis de 120 Gy. El contenido de clorofilas a y b, se vio afectado por efecto de la RG. En el cuarto capítulo se describe el primer reporte de *Leveillula taurica* de chile chilhuacle al sur de México, para confirmar la identidad del hongo se amplificó y secuenció la región espaciadora transcrita interna (ITS) de rDNA, usando primers universales. El análisis BLASTn mostró una identidad del 100% nt con los de *L. taurica* reportados en otros países como China y E.U. El quinto capítulo se evaluó el efecto de la dosis de radiación gamma (0, 10, 80 y 120 Gy) y sometidos a cuatro potenciales osmóticos ( $-0.036$ ,  $-0.072$ ,  $-0.092$  y  $-0.108$  MPa). Se evaluó la concentración de nutrientes, pH y la

conductividad eléctrica (CE) en los frutos en diferentes etapas de crecimiento a los 70, 90 y 130 días después del trasplante, se destaca el hecho de que la GR, el potencial osmótico y su interacción afectan diferencialmente el N, P, K, Ca y concentración de Mg, pH y CE en los frutos. El capítulo VI se evaluó el efecto de la RG y potenciales osmóticos en parámetros bioquímicos en plantas de la generación M<sub>1</sub> y mediante marcadores RAPD se determinaron los mutantes en la generación M<sub>2</sub>. Hubo reducción de clorofilas con la RG con 120 Gy, la radiación de 120 Gy incrementó la concentración de aminoácidos (29.08%), así como de azúcares en frutos con 80 y 120 Gy (20.23% y 20.25%), los potenciales osmóticos de -0.036 MPa influyeron de manera significativa en la concentración de aminoácidos y azúcares. En hojas se observó mayor concentración de Fe, Cu y Zn por efecto de RG y OP. Dos plantas mutantes con frutos de color rojo fueron obtenidas con la RG de 10 y 120 Gy. Un total de 57 fragmentos de PCR se amplificaron y 12 fragmentos (21.87%) revelaron polimorfismo con promedio de 2.4 bandas polimórficas por primers.

Por lo anterior se propuso el siguiente objetivo general. Evaluar las respuestas de crecimiento, fisiológicas, bioquímicas, concentración de nutrimentos y moleculares de chile chilhuacle, sometidos a radiación gamma de semillas y evaluar las características de los mutantes con base a su adaptación a diferentes potenciales osmóticos en la solución nutritiva.

## LITERATURA CITADA

**Adams, P. 1991.** Effects of increasing the salinity of the nutrients or sodium chloride on the yield, quality and composition of tomato grown in rockwool. HortScience, 66: 201-207.

**Agrawal, S. B. and D. Rathore.** 2007. Changes in oxidative stress defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) cultivars grown with and without mineral nutrients and irradiated by supplemental ultraviolet-B. Environmental and Experimental Botany, 59: 21-33.

**Ahloowalia, B. S., M. Maluszynski, and K. Nichterlein.** 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica, 135: 187-204.

- Alikamanoglu, S., O. Yaycili and A. Sen.** 2011. Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill), *Biological Trace Element Research*. 141: 283-293.
- Buck, J. S., C. Kubota and M. Jensen.** 2008. Effect of Mid-day reduction of high electrical conductivity treatment on the yield and quality of greenhouse cherry tomato. *HortTechnology*, 18: 460-466.
- Castañeda-Álvarez, N. P., C. K. Khoury, H. A. Achicanoy, V. Bernau, H. Dempewolf, R. J. Eastwood, and J. V. Müller.** 2016. Global conservation priorities for crop wild relatives. *Nature Plants*, 2, 16022.
- Choudhary, K. K., and S.B. Agrawal.** 2014. Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 1222-132.
- Falusi, O. A., O. A. Y. Daudu, and J. A. T. da Silva.** 2012. Effect of exposure time of fast neutron irradiation on growth and yield parameters of *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*. *African Journal of Plant Science*, 6: 251-255.
- Foley, J. A., N. Ramankutty, K. A. Brauman, E. S. Cassidy, J. S. Gerber, M. Johnston, and C. Balzer.** 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478: 337-342.
- Galindo, G. G., M. C. López, C. B. Cabañas, T. H. Pérez, and M. A. Robles.** 2002. Caracterización de productores de chile en el Altiplano de Zacatecas. In Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatecas. Folleto científico, México, pp. 2-102.
- García-Gaytán, V., F. C. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, G. A. Baca-Castillo, S. García-Morales.** 2017. The Chilhuacle Chili (*Capsicum annum* L.) in Mexico: Description of the Variety, Its Cultivation, and Uses. *International Journal of Agronomy*, 2017: 1–13.
- García-Gaytán, V., S. García-Morales, H. V. Silva-Rojas, L. I. Trejo-Téllez and F. C. Gómez-Merino.** 2016. First Report of Powdery Mildew in Chilhuacle Chili (*Capsicum annum*) Caused by *Leveillula taurica* in Southern Mexico. *Plant Disease*, 100: 2325–2325.

- Hanjra, M. A., and Qureshi, M. E.** 2010. Global water crisis and future food security in an era of climate change. *Food Policy*, 35: 365-377.
- Horn, L., H. M. Ghebrehiwot, and H. A. Shimelis.** 2016. Selection of novel cowpea genotypes derived through gamma irradiation. *Frontiers in Plant Science*. 7.
- IAEA.** 2015 mutant database. Vienna: International Atomic Energy Agency. Disponible en: <http://mvd.iaea.org/>.
- Madueño-Molina, A., J. D. García-Paredes, J. Martínez-Hernández y C. Rubio-Torres.** Germinación y crecimiento de frijolillo *Rhynchosia minima* (L.) DC con diferentes potenciales osmóticos. *Terra Latinamericana*, 24: 187-192.
- Octavio-Aguilar, P., L. G. Iglesias-Andreu., J. J. Bello-Bello, M. Luna-Rodríguez,** 2013. Efecto hormético de la radiación ionizante. *Ciencia y Desarrollo*. Mayo-Junio 2013: 3-9. En línea: [http:// cyd.conacyt.gob.mx/267/articulos/Efecto-hormetico-radiacion-ionizante.pdf](http://cyd.conacyt.gob.mx/267/articulos/Efecto-hormetico-radiacion-ionizante.pdf).
- Parra-Terraza, S., G. A. Baca-Castillo, R. Carrillo-González, R. Kohashi-Shibata, A. Martínez-Garza y C. Trejo-López.** 2004. Silicio y potencial osmótico de la solución nutritiva en el crecimiento de pepino. *Terra Latinoamericana*, 4: 467-473.
- Preciado-Rangel, P., G. A. Baca-Castillo, J. L. Tirado-Torres, J. Kohashi-Shibata, L. Tijerina-Chávez y A. Martínez-Garza.** 2003. Presión osmótica de la solución nutritiva y la producción de plántulas de melón. *Terra Latinoamericana*, 21: 461-470.
- SAGARPA.** 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Tester, M. and P. Langridge.** 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327: 818-822.
- Trejo-Téllez, L. I. and F.C. Gómez-Merino.** (2012). Nutrient solutions for hydroponic systems. In: Asao T (ed) *Hydroponics-A Standard Methodology for Plant Biological Researches*. InTech, Rijeka, Croatia. pp. 1-23.
- Villegas-Torres, O., G. P. Sánchez-García, G. A. Baca-Castillo, M. N. Rodríguez-Mendoza, C. Trejo. M. Sandoval-Villa y E. Cárdenas-Soriano.** 2005. Crecimiento y estado nutrimental de plántulas de tomate en soluciones nutritivas

con diferentes concentraciones de calcio y potencial osmótico. *Terra Latinoamericana*, 23: 49-56.

**Vincent, H., J. Wiersema, S. Kell, H. Fielder, S. Dobbie, N. P. Castañeda-Álvarez, and N. Maxted.** 2013. A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security. *Biological Conservation*, 167: 265-275.

**Wu, M., and C. Kubota.** 2007. Effect of high electrical conductivity of nutrient solution and its application timing on lycopene, chlorophyll and sugar concentrations of hydroponic tomatoes during ripening. *Scientia Horticulturae*, 116: 122-129.

**Yoon, Y., N. Kim, Jae-Sung. Kim and Jeong-Gyu. Kim.** 1999. Effect of low dose  $\gamma$  radiation on the uptake of mineral nutrients in chinese cabbage and radish. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 18: 334-348.

## **CAPÍTULO II.**

**CAPÍTULO II.**  
**THE CHILHUACLE CHILI (*Capsicum annuum* L.) IN MEXICO: DESCRIPTION OF  
THE VARIETY, ITS CULTIVATION, AND USES**

**Resumen**

El chile chilhuacle (*Capsicum annuum* L.) es una variedad nativa mexicana cuya producción ha sido muy valiosa debido a que es el componente principal del mole negro oaxaqueño, un platillo típico mexicano. Básicamente se cultiva en la Región Cañada de Oaxaca, México; dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. El chile chilhuacle se cultiva bajo sistemas agrícolas tradicionales, donde una serie de restricciones agronómicas asociadas con el proceso de producción y la incidencia y severidad de plagas y enfermedades representan impedimentos significativos que obstaculizan el potencial de rendimiento. Además la base genética está muy restringida. Bajo condiciones ambientales y de producción, el rendimiento promedio del chile chilhuacle puede llegar a 1 t ha<sup>-1</sup> de frutas deshidratadas, que pueden usarse en la industria alimenticia, química y farmacéutica. En esta revisión, resumimos el progreso actual en el cultivo de chile chilhuacle y esbozamos algunas pautas cruciales para mejorar la producción, así como otros temas de investigación que deben abordarse más afondo.

**Palabras clave:** chile chilhuacle, mole negro, plagas y enfermedades, rendimiento y alimento

## Abstract

The chilhuacle chili (*Capsicum annuum* L.) is a Mexican native variety whose production has been highly valuable because it is the main component of the Oaxacan black mole, a typical Mexican dish. It is basically grown in the Cañada Region of Oaxaca, Mexico; within the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve. Chilhuacle chili is cultivated under traditional agricultural systems, where a range of agronomic constraints associated with the production process and the incidence and severity of pests and diseases represent significant impediments that hinder the yield potential. Additionally, the genetic basis of the crop is highly restricted. Under such environmental and production conditions, the mean crop yield of chilhuacle chili can reach 1 t ha<sup>-1</sup> of dehydrated fruits, which can be used in the food, chemical, and pharmaceutical industries. In this review we summarize the current progress on chilhuacle chili cultivation and outline some crucial guidelines to improve production, as well as other research topics that need to be further addressed.

**Keywords:** Chilhuacle chili, black mole, pests and diseases, yield, food

## 2.1. INTRODUCTION

Chilies belong to the genus *Capsicum* (Solanaceae family), which is one of the most cultivated groups of species in the world. These diverse species are grown worldwide for vegetable, spice, ornamental, medicinal, and lachrymator uses and are a significant source of vitamins A and C (Hill *et al.*, 2013; Perry y Flannery, 2007). *Capsicum* is native to the tropical and subtropical Americas, and the majority of the genetic diversity is concentrated in Bolivia, Peru, Brazil, and Mexico. This genus comprises over 30 species and *C. annuum* is the most widely cultivated and economically important one. *C. annuum* was domesticated in Mexico thousands of years ago and includes both sweet and spicy fruits, with a myriad of shapes, colors, and sizes (Perry y Flannery, 2007; Aguilar-Rincón *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2010; Wang y Bosland, 2006; Scaldaferrro *et al.*, 2013; USDA-ARS, 2011). The remnants of

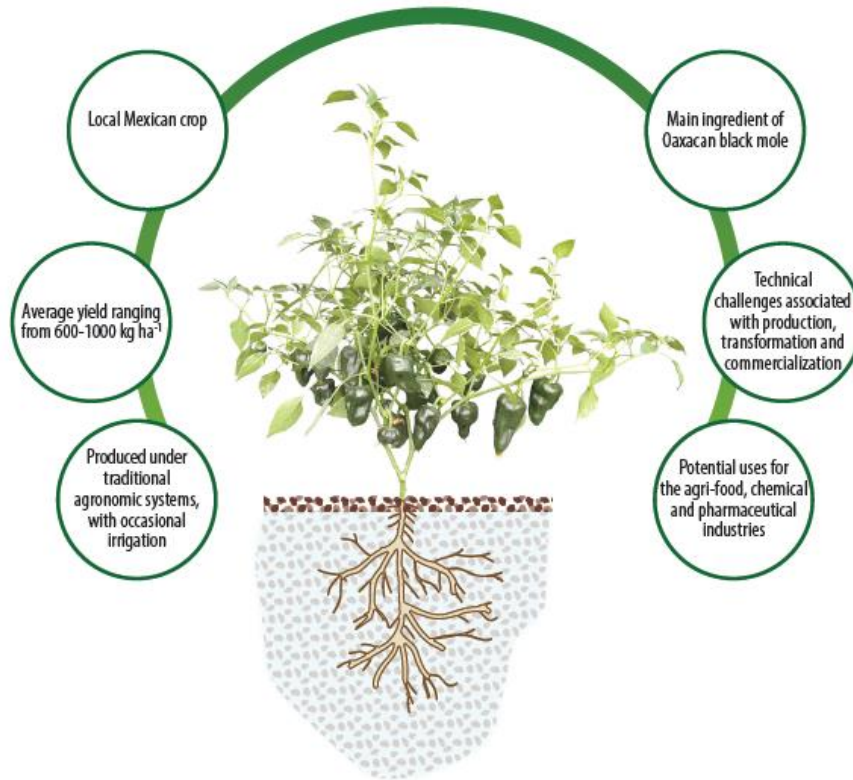


wild chili peppers recovered at various locations in Coxcatlán cave in the Tehuacán Valley, Mexico, and those identified in the Guilá Naquitz cave in the Oaxaca Valley, Mexico, indicate that chilies were harvested in the wild in Mexico more than 8,000, and their domestication and cultivation for the first time in Mesoamerica occurred approximately 6,000 years ago (Perry y Flannery, 2007; Perry *et al.*, 2007). It is believed that seed dispersal was performed by wild birds, while selection and domestication by humans gave rise to various types of fruit morphology and degrees of pungency (Hill *et al.*, 2013; Clement *et al.*, 2010). The chilhuacle chili is an endemic crop of the Cañada Region in the State of Oaxaca, Mexico, the only place in the world where it is produced.

The main markets to which Mexican chilies are exported include the United States, Japan, Canada, the United Kingdom, and Germany (SIAP, 2013). Currently, Mexico is the second world's leading exporter of fresh chilies and the sixth largest exporter of dehydrated ones. By entering this thriving export market, chilhuacle chili producers may find new market niches and expand their production and marketing potential. However, new technologies and innovations have to be developed to support a possible rise in production and commercialization. The locations where it is mainly cultivated are San Juan Bautista Cuicatlán, Tomellín, Valerio Trujano, Santa María Tecomavaca, San José del Chilar, and Santiago Domingullo, all within the Cañada Region in Oaxaca, Mexico.

The importance of the chilhuacle chili lies in its international recognition as a culinary spice in the preparation of the famous "Oaxacan black mole" (Mole Negro Oaxaqueño), using dehydrated fruits, while an alternative local dish called "Texmole" is prepared with fresh chili. A graphical abstract summarizing some important issues concerning the chilhuacle chili is displayed in Figure 1.

## Chilhuacle chili (*Capsicum annum L.*)



**Figure 1.** Summary of chilhuacle chili production, yield and potential uses.

The culinary and gastronomic value lies in the fact that this chili has unique characteristics in terms of aroma, color, and flavor, which are enhanced by the dehydration process (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). The culinary use of the chilhuacle chili in Oaxacan regional cuisine has been recognized as a component of Mexican cuisine by the Intangible Cultural Heritage of Humanity for the Organization of the United Nations for Education, Sciences and Culture (UNESCO) (UNESCO, 2010), which emphasizes the importance of this crop. Despite its importance in Oaxacan cuisine and the demand for it, chilhuacle chili is a species that tends to be increasingly less cultivated and is in danger of extinction according to SAGARPA Regional Offices' Joint Information System (Sistema de Información Coyuntural de las Delegaciones

SAGARPA, SICDE: <http://www.sicde.gob.mx>) (SICDE, 2013). According to López-López *et al.* (2016), new strategies for growing chilhuacle chili are needed because there are currently only a few producers who cultivate it in the state of Oaxaca. In this state, the development and generation of technological packages are practically nonexistent, which is reflected by the scarcity of research on production systems. For these reasons, it is necessary to undertake various strategies to deepen our knowledge of this crop to provide a solid foundation that permits its sustainable utilization. This research highlights different aspects of this crop generated in the areas where it is cultivated.

## **2.2. Culinary uses of chilhuacle chili by indigenous people**

The chilhuacle chili, or huacle chili, is mainly used by the Cuicatecos and Chinantecos native groups of Mexico. According to the National Commission for the Development of Indigenous Peoples (CDI: <http://www.cdi.gob.mx>) and the National Population Council (CONAPO, 2010), the Cuicateco population is slightly greater than 13,000, while the Chinanteco region has over 137,000 inhabitants, distributed mainly in Northern Oaxacan. The chilhuacle chili is mainly used by these towns for religious purposes at festivals such as the Day of the Dead, the Days of the Patron Saints of Towns, Christmas, and New Year's festivities, as well as family celebrations such as weddings and birthdays (López-López y Pérez-Bennetts, 2015).

The chilhuacle chili provides unique flavor characteristics, and each dish is recognized by the manner and the place in which it is prepared. Oaxacan black mole is the most widely recognized culinary specialty in which this chili is used; when it is prepared with traditional methods, a wide variety of local and international ingredients, such as peanuts, walnuts, almonds, cinnamon, cloves, seedless raisins, oregano, and Oaxacan table chocolate, is used (MacVeigh, 2008). As a result of its high demand and its increasing scarcity, the price of dehydrated fruits can vary between 25 and 38 US dollars per kilogram, making it one of the most expensive ingredients in Mexican cuisine. As an alternative, and with the aim of lowering production costs, restaurants have opted to substitute the chilhuacle chili for the guajillo and ancho chilies to prepare

black mole; however, this also affects the original flavor and consistency of this variant of Mexican mole.

### **2.3. Main topics addressed in the literature on chilhuacle chili**

Because of its importance, there are various publications on the culinary richness of this chili. The fruit is scarce, produced during a short period, and its Nahuatl name suggests a pre-Columbian domestication ([Andrews, 1998](#); [Bosland y Votava, 2000](#)). There are three known types of chilhuacle chili cultivar that are differentiated by their color: the yellow, red, and black chilies. These characteristics impart a deep and intense flavor to the famous Oaxacan black mole dish ([DeWitt and Bosland, 2009](#)). The chilhuacle chili is one of the most widely consumed species (though not in large volumes) in the State of Oaxaca, in addition to other chilies, such as the agua, pasilla, guajillo, tabiche, tusta, and paradito ([Castellon-Martínez et al., 2012](#)). This widespread consumption ensures that the diversity of local types of chilhuacle chili is not lost in these various localities, which promotes conservation based on consumption. Chili continues to be a catalyst in the Mexican cuisine and has been employed for thousands of years to modify the flavors of the basic diet of the country, surviving throughout the centuries in spite of the introduction and the influence of culinary traditions from other countries ([Long, 2011](#)). Generally, it is the local chilies that impart a unique characteristic to the regional food, as is the case for the use of the chilhuacle chili to prepare mole in Oaxaca or the Habanero in Yucatecan cuisine.

Other publications consider the chilhuacle chili to be a variety that is in danger of extinction, highlighting the great importance of conducting research into its production system. According to the SAGARPA Regional Offices' Joint Information System ([SICDE, 2013](#)), Mexico is the center of origin and diversity of *C. annuum*; however, there is no accurate record of chili varieties, and some of them are cultivated to only a limited extent, thus producing only low yields, a factor driving the high market price, as is the case for the chilhuacle chili. Importantly, chilhuacle chili is itself in danger of disappearing and being replaced by other types of chili. Year by year, fewer farmers cultivate it, as a result of migration and farm abandonment, because young people are

less interested in agriculture. This phenomenon is complex, though main reasons are related to the very low profits farmers obtain from their crops. We think that technology can bring about new tools to farmers to cultivate chilhuacle chili and increase profits.

The cultivation of the chilhuacle chili, and other species, should be preserved and promoted or these chilies could disappear from the Oaxacan fields. This crop can obtain a high market value because of its desired taste and the limited extent of production. Nevertheless, there is a paucity of research on the chilhuacle chili. Among those publications that exist, the literature covers topics related to management and production strategies, culinary uses, and the recovery of genetic resources. This last section aims to emphasize the fact that chilhuacle chili is undergoing the process of extinction, demonstrating the necessity to strengthen efforts to implement strategies for its study and for the purpose of its conservation and sustainable use. In addition to exploring all biological aspects of the chilhuacle chili, technological packages for its production, processing, and sale that are based on technological innovations and improvements in organizational, commercial, and managerial strategies ([Salles-Filho et al., 2012](#)), need to be developed.

#### **2.4. Origin, taxonomy and botany of chilhuacle chili**

Pungency and color of chili fruits are crucial factors in determining their quality and commercial value. Such characteristics depend on the genotype and time of planting and harvest ([De, 2003](#)). In particular, the origin of chilhuacle chili is restricted to the Cañada Region in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve, which is located in southern Mexico, within the states of Puebla and Oaxaca (Figure 2). Most species that inhabit this region are restricted to the limits of this area and are therefore endemic species ([Rzedowski, 2006](#); [Dávila et al., 2002](#)).



**Figure 2.** Cañada Region in the State of Oaxaca, Mexico, the only place in the world where chilhuacle chili is produced. Cañada Region is located within the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve in southeast Mexico, within the State of Puebla and Oaxaca.

Chilhuacle chili is a cultivar of the species *C. annuum* (Raghavan, 2007). *Capsicum annuum* var. *annuum* is the domesticated form and the most important in Mexico and across the globe; it also has the highest morphological variability because it comprises the majority of the chili and pepper types grown in Mexico (Montes-Hernández, 2010). In Mexico, the National Commission for the Knowledge and Use of Biodiversity (CONABIO, for its acronym in Spanish) has compiled detailed taxonomic records for *Capsicum annuum* var. *annuum* (SIOVM, 2011).

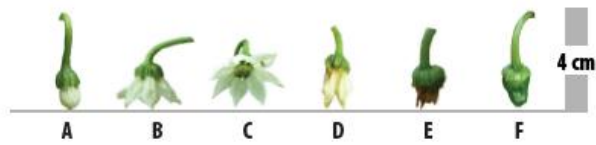
The chilhuacle chili is a plant of dichotomous branching. Its root may reach depths of 70 to 120 cm. The bulk of the roots is located within a soil depth of 5–40 cm. The plants have a green cylindrical herbaceous main stem that is semiwoody at the base and slightly pubescent. The growth of the stem is limited, and the stem divides into 3 or 4 branches or secondary stems between the heights of 10 and 40 cm. The dark green leaves are lanceolate or oval, have an entire lamina margin, and are weakly pubescent with a nonerect petiole. The flowers appear solitary in the node of branches of the stem, and each branch can have 5 to 6 or more flowers (Figure 3).





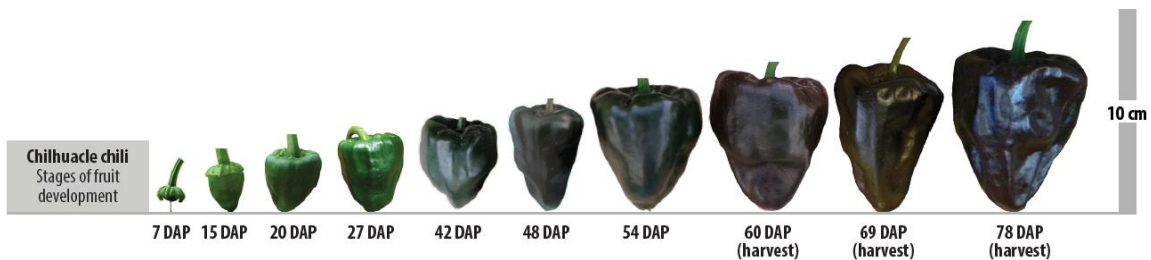
**Figure 3.** Morphology of a mature chilhuacle chili plant and anatomy of fruits. (1) A chilhuacle plant during fruit development. (2) A mature fruit. (3) A stigma. (4) Stamens. (5) Petals. (6) Flowers. (7) Leaves. (8) Cross section of immature fruit showing septum and seeds. (9) Immature seed of the fruit. (10) Mature seeds are yellow.

Flowers are perfect and regular and composed of 6-7 sepals partially fused together and 6-7 petals. Their position is intermediate, according to the International Plant Genetic Resources Institute ([IPGRI, 1995](#)). The androecium is composed of 7 equal stamens, bilocular and dehiscence inwards or terminal. The ovary is superior, of 2-3 carpels with a single style and stigma (Figure 4). Chilhuacle chili flowers are self-pollinated, though bees, wasps, and ants may contribute to cross pollination, which is common when it is cultivated under field conditions ([Bosland y Votava, 2000](#)).



**Figure 4.** Flower developmental stages of chilhuacle chili. (A) Floral bud 1 day after pollination (DAP). (B) 2 DAP. (C) 4 DAP. (D) 5 DAP. (E) 7 DAP. (F) Fruit development 8 DAP.

During the early stages of growth, the fruit appears round and the calyx covers much of the outside. Subsequently, the fruit acquires an elongated form, with a 4 to 8 mm thick peduncle. When the fruit acquires its final size and shape, the calyx becomes immersed in the fruit and the thickness of the peduncle decreases (Figure 5).



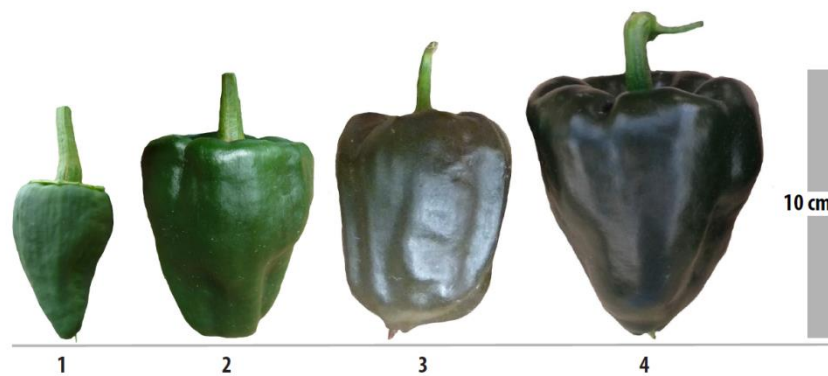
**Figure 5.** Development of the chilhuacle chili fruit. The fruit develops 7 days after pollination (DAP). At the beginning of fruit development, the calyx covers a substantial portion of the outside of the fruit (15 DAP). Subsequently, the fruit acquires an elongated form, with a thick peduncle (20 to 27 DAP). When the fruit has achieved its final size and shape, the color is black or very deep purple and the calyx is immersed in the fruit (42 to 54 DAP). Developed fruits can be harvested between 60 and 78 DAP.

The fruit is a berry in the form of a capsule, with trapezoidal shape and a mean size of 10 cm in length and 8 cm in equatorial diameter. Fruits are usually consumed when they reach maturity (60 to 78 days after pollination (DAP)) and have been dehydrated. Fruit color varies according to developmental stages (Table 1, Figure 6), and this characteristic is crucial to determine the right moment of harvesting.



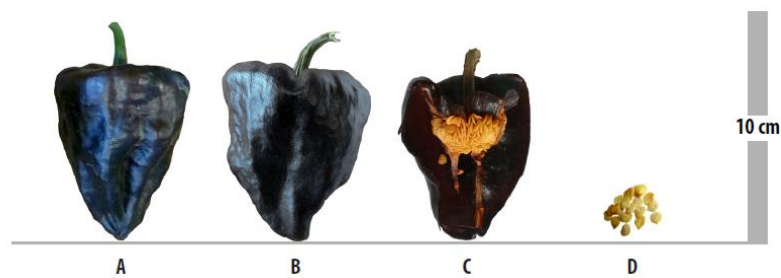
**Table 1.** Chilhuacle chili developmental stages and color changes from immature to mature fruits.

Color scale	Developmental stage	Days after pollination (DAP)	Color			Description of color
			Luminosity	Chroma	Hue	
1	Immature	15	22.8	7.0	139.2	Light green
2	Green	27	22.4	7.1	138.9	Bright green
3	Green-mature	42	22.7	7.5	141.6	Bright dark green
4	Mature	54	21.0	5.3	155.9	Completely dark green



**Figure 6.** Color change from immature to mature fruits of chilhuacle chili: (1) Immature fruit. (2) Green fruit. (3) Green mature fruit. (4) Mature fruit.

Changes in color of mature dehydrated fruits are depicted in Figure 7. Once the fruits have been dehydrated, seeds retain their germination capacity for 3 to 4 years (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010; Espinosa, 2011). In order to preserve seed germination capacity, local farmers keep seeds within the dehydrated fruits, until the new production cycle starts.



**Figure 7.** Dehydrated fruit of chilhuacle chili. (A) A mature chilhuacle fruit 78 DAP. (B) A dehydrated fruit. (C) A dehydrated fruit, showing the apex, which consists of a thick pericarp and placental tissue to which the seeds are attached. (D) In mature dehydrated fruits, the seed are flattened and yellow in color.

## 2.5. Agronomic practices for chilhuacle chili production

In Mexico, the State of Oaxaca has one of the highest diversity levels of chilies, including chilhuacle chili (Castellón-Martínez *et al.*, 2014; Kraft *et al.*, 2010). Under Oaxacan environmental conditions, some agronomic constraints are associated with the production process of this crop, and the incidence and severity of pests and diseases are among the most significant impediments that hinder the potential of this crop (López-López and Castro, 2005).

Chilhuacle chili, as well as soledad, costeño, and agua chilies, which are also native to Oaxaca, are domesticated cultivars grown under traditional agricultural systems, where no sophisticated technologies are used (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009). In the Cañada Region, seeds of this chili are germinated at the end of the dry season (i.e., May). Once seeds germinate, plantlets are transplanted to the crop fields in June and July, during the raining season. Eventually, local farmers irrigate the crop if necessary. Harvest takes place in October, once the rainy season has ended.

The greatest yield of chilhuacle chili has been obtained with a density of 53,000 plants per hectare, although the largest fruits with the greatest dry masses can be obtained at a lower density (i.e., 40,000 ha<sup>-1</sup>) (Langlé, 2011). Furthermore, pruning increases the yield per plant and per unit surface area, although the fruits tend to be smaller (Langlé, 2011). When nutrient solutions are applied during irrigation, the best agronomic responses are observed with the Steiner, Steiner (1961) and Escobar (1993) nutrient solutions (Espinosa, 2011).

When grown under field conditions, this crop performs better in friable and well-drained, sandy loam soils with pH values between 6.5 and 7.5, with a minimum depth of 35 to 50 cm (Lim, 2013; Medina *et al.*, 2006), and slopes ranging from 1 to 10%. Luvisols, Cambisols, and Phaeozems are the main types of soils where this chili variety is most often cultivated (López-López and Castro, 2005). The terrains where chilhuacle

chili is cultivated are located from 687 to 1085 meters above sea level (masl) (López-López and Castro, 2005).

Climates of the region where this variety is produced are predominantly semiarid and warm (BSh climate), with a mean annual rainfall of 450 mm, the majority of which falls between June and September, and a mean annual temperature higher than 22°C, with temperatures higher than 18°C in the coldest month (Granados-Sanchez *et al.*, 2005; Vidal-Zepeda, 2005).

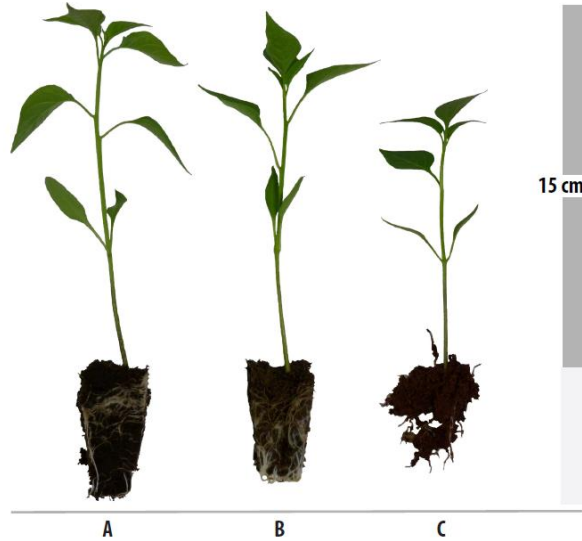
### 2.5.1. Seedling production

Chilhuacle chili seedling production is accomplished by sowing the seeds in soil, with selected seeds obtained from well-selected mature chilies. The seedbed is prepared in an open (nonshaded) area, and the soil is manually tilled with a hoe or a shovel. For the seedbed, a mixture of one-third of properly composted cattle manure, another third of local soil, and a remaining third of fine sand is prepared. Planting beds of 1 m<sup>2</sup>, with 20 cm borders on the sides, are created using this substrate mixture. The seeds are broadcast-sown and covered using a broomstick. The soil should be moist for as long as the seedlings are in the seedbed, without flooding; hence, proper drainage is necessary with light and frequent irrigation. Similar practices for obtaining seedlings of other varieties of peppers native to Oaxaca, such as the soledad and agua chilies, have been described by various nurseries (Nuez *et al.*, 2003). A solution of propamocarb chlorohydrate (64% aqueous solution) at a concentration of 0.5 g L<sup>-1</sup> may be applied to prevent fungal diseases when planting chilhuacle chili seedlings in polystyrene trays, with a 1 : 1 mixture of peat : perlite, with 2 seeds sown per cavity in damp substrate and irrigation to saturation (Espinosa, 2011; Nuez *et al.*, 2003). The success of the chili production process lies in the strength and size of the seedling used in planting, which depends on seed quality, seedbed preparation, soil disinfection, nutrient applications, and general handling in the nurseries (Reveles *et al.*, 2006). Local farmers of the Cañada Region do not disinfect soils, though they use other sustainable practices such as crop rotation.

In our experimental conditions, seedling emergence occurred 7 days after sowing, which differs from other chilies such as poblano with a germination period of 9 days

(De la Cruz, 2008), mirasol with 10 to 12 days, árbol and ancho with 3 days, and guajillo with 4 days to start germination (Ayala, 2012).

Under greenhouse conditions, transplantation of chilhuacle chili plants in polythene bags with a sand substrate was performed successfully 57 days after sowing; plants achieved a mean height of 20 cm with 2 true leaves fully formed and extended during this growth period (Espinosa, 2011). For seedling growth and development, the choice of substrate is a key factor that contributes to seedling quality (Ortega-Martínez *et al.*, 2010). We have observed that the choice of substrate supplemented with 25% Steiner's nutrient solution (Steiner, 1984) affects the growth and development of chilhuacle chili plantlets, which is most evident 50 days after planting (Figure 7). Plants that developed in peat were taller and had a greater number of leaves, and the root and substrate remained intact when the seedlings were removed from the seedbed (Figure 8 (A)), while those cultivated in agricultural local soil were shorter than those that developed in peat, although the root ball had similar characteristics to those developed in peat (Figure 8 (B)). The beneficial effect of peat on plant growth may be attributed to its biological, physical, and chemical properties that improve nutrient availability to plant roots (Martínez and Roca, 2011), whereas the local soil conferred higher compaction and hence less water and nutrient availability to plants. Tezontle, a Mexican local volcanic gravel, is inert and its water retention capacity is very low (Pérez-López *et al.*, 2014). In our experimental conditions, plants that developed in tezontle as substrate were shorter than those grown in peat or local soil, and the root ball had a lower transplantation value given that it disintegrated easily (Figure 8 (C)).



**Figure 8.** Characteristic chilhuacle chili seedlings and their root ball in three different substrates 50 day after planting. (A) Seedling developed in peat. (B) Seedling developed in common soil. (C) Seedling development in volcanic gravel. Plant were irrigated every other day with 25% Steiner’s nutrient solution.

The choice of substrates for planting is crucial because it provides appropriate conditions to the crop for root growth (Ortega-Martínez *et al.*, 2010). One of the most globally used substrates for seedling production is peat moss because its main characteristics provide excellent germination and seedling growth. However, the high cost and non-sustainable exploitation of peat are restricting its use (Fernández-Bravo *et al.*, 2006), which highlights the importance of finding new local substrates that ensure excellent germination of genetic resources such as the chilhuacle chili.

### 2.5.2. Chilhuacle chili nutrient management

Chilhuacle chili is mainly cultivated under rainfed conditions, eventually supplemented with irrigation systems. When irrigated, water is applied every 8 days, for a total of 17 irrigations during the crop cycle. The irrigation is applied to small surface areas, ranging from 2,500 to 5,000 m<sup>2</sup>, and occasionally on land areas of 1 ha (Espinosa, 2011). A chilhuacle chili fertilization program may comprise inorganic fertilizer applications at 25 and 46 days after transplantation, while a number of producers apply 200 kg of 17-17-17 (NPK) fertilizer or 200 kg of urea (equivalent to 92 kg of N ha<sup>-1</sup>) for each growth cycle (López-López and Castro, 2005). Interestingly,

N doses applied by local Oaxacan producers of chilhuacle chili are low compared to that of the recommended fertilizer application for soledad chili (also native to the State of Oaxaca), which are 400, 300, and 300 kg ha<sup>-1</sup> N, P, and K, respectively, in the municipalities of Loma Bonita, Tuxtepec, Valle Nacional, and Santa María Jacatepec, which have sandy-crumbly and sandy-clayey soil textures (Reyes, 2005). Under this management regime, the mean yield ranges from 600 to 1000 kg ha<sup>-1</sup> of dehydrated chili (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010; Espinosa, 2011), with N, P, K, Ca, and Mg being the most important nutrients affecting yields (Salazar-Jara and Juárez-López, 2013). The fertilization regimes of other varieties of chilies may be relevant to chilhuacle chili production, but regardless of that, soil characteristics must also be taken into account for production purposes. For example, for the cultivation of local and commercial varieties of chilies in Yucatán, Mexico, it is recommended to apply 280-200-330 kg ha<sup>-1</sup> NPK plus 10 t ha<sup>-1</sup> of chicken manure distributed in three stages as follows: first, at the time of the transplant, all of the chicken manure and half of the N, P, and K; the second application during flowering, applying 25% of N and 50% of the remaining P and K; and finally, the remaining quantity of N after the third harvest (De la Cruz y Avilés, 2000). In the production of mirasol chili in loam-textured soils with a mean organic matter content of 1.93%, pH of 7.8, and electrical conductivity of 0.63 dS m<sup>-1</sup>, in Zacatecas, Mexico, the application of 200-160-100 kg ha<sup>-1</sup> NPK + calcium has been recommended (Bravo *et al.*, 2005). In this variety, the application of 210-150-100 kg ha<sup>-1</sup> NPK increased the total yield and the plants produced better quality dried fruit (Cabañas *et al.*, 2005). Accordingly, the application of 120-60-00 kg ha<sup>-1</sup> NPK for mirasol variety cultivated in San Luis Potosí (Mexico) highlands has been recommended to be applied in 2 stages: first, before the third irrigation, half of the N and all the P (i.e., 60-60-00 kg ha<sup>-1</sup> of NPK) are applied, and the remaining 60 kg of N is applied at the onset of flowering. With this fertilization dosage, the mean yield is 1.2 t ha<sup>-1</sup> of dry chili at planting densities of 30,000 plants ha<sup>-1</sup> (Ramiro, 1992).

In general, yields are affected by various factors including genotype, climate, soil fertility, fertilization dose, pest and disease control and management, and harvesting and processing methods. Regional and seasonal variations in the environment, cultural practices, the availability of N, and the absorption efficiency of N by the plant are also

considered to be determining factors for yield (Hartz *et al.*, 1993), although neither the total production nor the productivity per plant or per surface area increases synchronously with nutrient supply (Wiesler, 2012). In fact, fertilization can have secondary, often unpredictable effects on growth and yield through changes in growth pattern, plant morphology, anatomy, or chemical composition, which can increase or decrease the resistance or tolerance of plants to biotic and abiotic stress factors (Huber *et al.*, 2012). Research approaches that target the *Capsicum* genus that scarcely study genotypes such as the chilhuacle chili are required to determine the precise physical environment and management conditions that should be implemented.

With respect to agronomic management, there are two greenhouse studies of chilhuacle chili. In the first one, different planting densities and the pruning of side stems were evaluated, reporting that the highest yields were obtained with high densities and without pruning, using the Escobar Nutrient Solution (Langlé, 2011; Escobar, 1993). This solution has been used for the growth of plantings established on substrates such as perlite and rockwool. The solution has the following concentrations (in mEq L<sup>-1</sup>) of anions, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (13.5), H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (1.5), and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1.35), and of cations, K<sup>+</sup> (5.5), Ca<sup>2+</sup> (4.5), and Mg<sup>2+</sup> (1.5). In the second study, physiotecnical and quality variables of chilhuacle chili fruits from plants cultivated using Escobar (1993), Steiner (1961), and Urrestarazu (Urrestarazu, 2015) nutrient solutions were tested (Espinosa, 2011). Plants exhibited a better response to the Steiner and Escobar nutrient solutions as a consequence of the ionic mutual ratio (Escobar, 1993), which is defined as a mutual relationship among anions (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) and a mutual relationship among cations (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup>). Therefore, if the relationship among them is adequate, the plant can achieve its maximum potential (Trejo-Téllez and Gómez-Merino, 2012). Although the effects of nutrients on the growth and yield of the chilhuacle chili can be explained in terms of the function of these elements in plant metabolism, in the *Capsicum* genus, the demand for nutrients such as N and K has been observed to increase during the flowering, fruiting, and fruit-filling stages (Majorro *et al.*, 2005). In varieties of chilies such as jalapeño, habanero, and a number of commercial hybrids, the levels of N and K significantly affect plant growth, stem diameter, number of leaves, fruit yield, pungency,



and capsaicin levels (Báez *et al.*, 2002; Johnson and Decoteau, 1996; Medina-Lara *et al.*, 2008).

### 2.5.3. Pests and diseases

The chilhuacle chili has various problems of a phytosanitary nature, such as the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) and insect vectors of viruses (aphids and whiteflies). The pepper weevil is one of the most important insect pests of this crop (Espinosa, 2011), especially during the flowering and fruiting stages. The larva of this insect drastically reduces fruit number, causing early fruit drop, premature ripening, and fruit deformation, which together may reduce the harvest by 90% (Bhuvaneshwari *et al.*, 2013; Seal and Schuster, 1995). Although there is no recommended control method described for preventing pepper weevil damage in chilhuacle chili, generally, a chemical control based on chlorpyrifos, oxamyl, and fipronil at doses of 720, 520, and 50 g of active ingredient per hectare, respectively, is recommended (Mena, 2006; Garza, 2001). Nevertheless, the best prevention method is to select genotypes displaying resistance against such biotic stress factors. Accordingly, we are currently creating novel genetic diversity using gamma radiation by  $^{60}\text{Co}$  and the evaluation of the first-generation of mutant varieties is underway, which may result in a major breakthrough to increase diversity in chilhuacle chili in Mexico.

Though important pests and diseases in chilhuacle chili plants are being documented, only a few insect pests and pathogens have been reported so far. Just recently, we have published the first report of powdery mildew in chilhuacle chili caused by *Leveillula taurica* in southern Mexico (García-Gaytán *et al.*, 2016). Therefore, more in-depth studies on those phytosanitary problems need to be conducted in order to ensure a sustainable crop production system.

### 2.5.4. Fruit dehydration

The crop is cultivated to produce dried chilies to be sold in local markets in Oaxaca and Puebla, Mexico. Dehydration is performed in areas with slopes greater than 5%, where ripe fruits are placed on stone beds and left under direct sunlight. This procedure has a considerable influence on the color, flavor, texture, and nutritional



quality of the dried chilies. This method also prevents any damage associated with excessive moisture (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). However, the labor is costly and involves a large number of working hours because each day the fruit has to be taken out of the sun, turned over, and stored for the afternoon until a suitable moisture level for sale at the local markets is achieved. Hence, one area for innovation is the postharvest handling procedure, mainly in relation to the dehydration process.

## **2.6. Chilhuacle chili may be more than a spicy culinary fruit**

In general, products derived from *Capsicum* fruits include fresh, dried, or pickled pepper, ground powders, and processed products such as purees, sauces, and oleoresins. Oleoresins contain a significant amount of esters of capsorubin, capsanthin, cryptoxanthin, zeaxanthin, and other carotenoids (Govindarajan and Salzer, 1986; Kothari *et al.*, 2010), used in foodstuff and cosmetics, and serve as a source of the pungent component capsaicin for pharmaceutical products (Pruthi, 2003; Zachariah and Gobinath, 2008) or self-defense weaponry (Reilly *et al.*, 2001). Bioactive compounds present in *Capsicum* fruits display antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antiulcer, and antiobesity pharmaceutical properties, among others, and they also promise other health benefits (Asnin and Park, 2015). Furthermore, these fruits exhibit a wide range of pharmacological activities, including chemopreventive, analgesic, antilithogenic, antidiarrhoeal, antiallergic, antidiabetic, antihypertensive, hypoglycaemic, antimicrobial, antioxidant, antifungal, and antiviral properties (Khan *et al.*, 2014).

Compounds known as capsaicinoids cause the pungency of chili pepper fruit. Capsaicinoids include capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin, and homocapsaicin, with capsaicin being the primary capsaicinoid in chili pepper (i.e., accounting for up to 80% of capsaicinoid content of fruits) (Fattori *et al.*, 2016). We determined the capsaicinoid concentrations in two groups of mature chilhuacle chili fruits (Table 2). In 78 DAP fresh fruits the concentration of capsaicin (in dry basis) was lower than that observed in dehydrated fruits. Moreover, the concentrations of dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin, as well as the pungency value, were higher in dehydrated fruits. When comparing these

values with other chilies produced in the same region, chilhuacle chili has a higher content of capsaicinoids and pungency value than miahuateco, tecomatlán, and mulato but a lower concentration of capsaicin and less pungency than copi (Morán-Bañuelos *et al.*, 2008). Our results demonstrate that the concentrations of capsaicin and capsaicinoids and the pungency in dehydrated chilhuacle fruits are higher than those found in other chili varieties including guajillo, ancho, pasilla, and puya. However, values found in fruits of jalapeño, mirasol, morita, serrano, chipotle, de árbol, piquín, and habanero are higher than those found in chilhuacle (Orellana-Escobedo *et al.*, 2013). Capsaicinoid concentrations in chilies may vary according to the genotype, geographic origin, and climatic conditions where they are produced (Eissa *et al.*, 2007). Nonetheless, the genotype is the most critical factor (Meckelmann *et al.*, 2015). Since capsaicin has therapeutic applications (Khan *et al.*, 2014; Fattori *et al.*, 2016; Morán-Bañuelos *et al.*, 2008), chilhuacle chili may deliver diverse health benefits.

**Table 2.** Capsaicin and capsaicinoid concentrations and pungency of different chilies native to Mexico.

Chili variety	Capsaicin (mg kg <sup>-1</sup> )	Dihydr capsai cin (mg kg <sup>-1</sup> )	Nordihydro-capsaicin (mg kg <sup>-1</sup> )	Pungency (SHU)	Reference
Chilhuacle (78 DAP)	161.0	47.0	9.0	3379	—
Chilhuacle (dehydrated)	235.0	142.0	53.0	6420	—
Miahuateco	63.6 267.4	45.5	na	1637	*
Copi	54.6	167.7	na	6525	*
Native Tecomatlán	29.5	35.8	na	1354	*
Mulato	22.85	49.5	na	1183	*
Guajillo	42.82	36.85	na	961.13	**
Ancho	49.21	42.19	na	1368.60	**
Pasilla	53.88	68.76	na	1899.34	**
Puya	373.51	67.40	na	1952.61	**
Jalapeño	343.77	210.40	na	9400.83	**
Mirasol	338.25	231.70	na	9426.09	**
Morita	627.48	334.94	na	10838.24	**
Serrano	883.04	399.77	na	16538.78	**
Chipotle	1293.36	552.65	na	23114.68	**
De árbol	2656.74	641.74	na	31155.10	**
Piquín	9097.35	1031.57	na	59381.77	**
Habanero		4023.63	na	211247.65	**

SHU: Scoville Heat Units. na: not available. DAP: days after pollination. \* Orellana-Escobedo *et al.*, 2013; \*\* Eissa *et al.*, 2007

Finally, *Capsicum* fruits have an enantiomeric composition of phytochemicals. Many of these are chiral molecules that can exist in plants in different enantiomeric forms, such as the pepper aroma compound linalool (Jiang and Kubota, 2004), which occurs naturally in one enantiomeric form but experiences racemization during postharvest treatment (Asnin and Park, 2015; Polak, 2010). In the case of the chilhuacle chili, all these chemical and pharmaceutical properties need to be studied in greater depth in a new research environment improved by the development and validation of new analytical protocols.

## **2.7. Conclusions and Perspective**

The chilhuacle chili is recognized as a unique ingredient of Mexican cuisine, especially as the characteristic seasoning of Oaxacan black mole. As an endemic genetic resource of Mexico, it is necessary to implement various innovative strategies throughout the value chain that will ensure its conservation and sustainable use.

For the thematic review of the chilhuacle chili, only 15 publications from Mexico were found, which demonstrates the clear need to further study this crop and its uses. In environmental terms, the effects of global climate change on agriculture in Mexico could reduce national agri-food production by 25.7% by 2080 (Moyer, 2010), if relevant strategic measures are not taken to address this global phenomenon. On the other hand, the country's population continues to grow, which also makes it necessary to develop efficient strategies that ensure food and energy security. An advantage in terms of global politics is that Mexico has provided numerous nutritional elements that have enriched international gastronomy because, as a megadiverse country, this nation is the center of origin and genetic diversity of numerous crops such as corn, squash, beans, and chilies. This diversity of food crops has long been valued by international agencies such as UNESCO, which recognized Mexican food as an Intangible Cultural Heritage of Humanity in 2010. Oaxacan black mole and the chilhuacle chili have high nutritional and gastronomic values that justify any innovation initiative undertaken to improve knowledge of their cultivation and use. Nevertheless, only a few producers are growing this variety to date. In the face of these challenges and opportunities, the lines

of research, technological development, and innovation that may be proposed can range from basic studies on the genomic, biochemical, and genetic variability of crop physiology to issues related to its use and possible new applications. Characterization of nutritional and nutraceutical properties, development of new drying and processing strategies for the product, improvements in the organization and training of producers, exploration of new market niches and international markets for chili and Oaxacan black mole, and the general management of the products obtained are all required. The benefits of these initiatives could be obtained by the original producers through, perhaps, the opening of Oaxacan cuisine gourmet restaurants managed by the producers themselves. This last possibility represents one of the major challenges for the development of indigenous peoples and the promotion of their cuisine internationally because, in addition to their high linguistic diversity (considering that each Chinanteco town has its own linguistic variation) and cultural diversity, there are serious limitations in terms of education level, mastery of other languages, and resistance to organization and trade, among others. Therefore, any strategy that aims to improve the use and exploitation of this chili genotype will have to consider the human factor as a determinant of the success of such projects. Our team is currently creating the generation of new mutants, with the aim of increasing the genetic diversity of chilhuacle chili in Mexico, and we have published the first report of powdery mildew in chilhuacle chili caused by *Leveillula taurica* in southern Mexico. In terms of technological innovations, studies that evaluate the oil content of the seeds are required to support their use as seasoning and flavoring ingredients, while alternative uses of the fruit and seeds in the chemical and pharmaceutical industries await further investigation. The generation of standards for good agricultural practices, fair trade, and the appropriate integration of the links in the value chain will help to better position and protect the product in the marketplace.

## Disclosure

The current address of Soledad García-Morales is CONACYT-CIATEJ Plant Biotechnology, 45019 Zapopan, Jalisco, Mexico.

## Competing Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this work.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Mexico's National Science and Technology Council (CONACYT-Mexico), as well as the Plant Nutrition Laboratory and the Sustainable Agri-Food Innovation program of the Colegio de Postgraduados, for the support and facilities granted for this research.

## 2.8. LITERATURE CITED

- Aguilar-Rincón, V. H., T. Corona-Torres, P. López-López, L. L. Moreno, M. R. Meraz, H. V. Mendoza, y J. A. A.** 2010. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI.
- Andrews, J. S.** 1998. Pepper Lady's Pocket Pepper Primer, American Botanical Council and University of Texas Press, Austin, Tex, USA.
- Araceli, A. M., P. L. Morrell, M. L. Roose, and S.-C. Kim.** 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96: 1190–1202.
- Asnin, L. and S. W. Park.** 2015. Isolation and analysis of bioactive compounds in Capsicum peppers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 254–289.
- Ayala, V. M. J.** 2012. Analysis of growth and seed quality of three types of chili (*Capsicum annuum* L.) [Thesis], Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Montecillo, Mexico.

- Báez, M. A., L. T. Chávez, P. S. García, L. A. A. Navarro, A. J. E. Estrada, and A. M. Garza.** 2012. Jalapeño pepper production under fertigation as a function of soil-water tension, nitrogen and potassium nutrition. *Terra Latinoamericana*, 20: 209–215.
- Bhuvanewari, G., R. Sivaranjani, S. Reeth, and K. Ramakrishnan.** 2013. Application of nitrogen and potassium efficiency on the growth and yield of chilli *Capsicum annuum* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2: 329–337, 2013.
- Bosland P. W. and E. J. Votava.** 2000. Taxonomy, pod types and genetic resources, in *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. Crop Production Science in Horticulture, P. W. Bosland and E. J. Votava, Eds., CABI Publishing, New York, NY, USA, pp. 14–38.
- Cabañas, C. B. G. G. Galindo, D. F. Mojarro, L. A. Bravo and D. J. A. Zegbe.** 2005. Fertilización y arreglo topológico en el rendimiento y calidad de fruto del chile Mirasol (*Capsicum annuum* L.) en Zacatecas, México, in Segunda Convención Mundial del Chile, Consejo Nacional de Productores de Chiles de México, Mexico City, Mexico, pp. 226–230.
- Castellón-Martínez, E., J. C. Carrillo-Rodríguez, J. L. Chávez-Servia, and A. M. Vera-Guzmán.** 2014. Phenotype variation of chile morphotypes (*Capsicum annuum* L.) native to Oaxaca, Mexico. *Phyton*, 83: 225–236.
- Castellon-Martínez, É., J. L. Chávez-Servia, J. C. Carrillo-Rodríguez, and A. M. Vera-Guzmán.** 2012. Preferencias de consume de chile (*Capsicum annuum* L.) nativos en los valles centrales de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35: 27–35.
- Clement, C. R., M. de Cristo-Araújo, G. Coppens D'Eeckenbrugge, A. Alves Pereira, and D. Picanço-Rodrigues.** 2010. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*, 2: 72-106.
- CONAPO.** 2010. Consejo Nacional de Producción. Indicadores de Demográficos Básicos. Datos de Proyecciones México.

- Dávila, P., M. C. Arizmendi, A. Valiente-Banuet, J. L. Villaseñor, A. Casas, and R. Lira.** 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity & Conservation*, 11: 421-442.
- De la Cruz T. D. J. and B. W. I. Avilés.** 2000. Technology for the production of yellow chili,” in *Opciones Hortícolas para Suelos Pedregosos*, B. W. I. Avilés, B. F. Santamaría, T. D. J. De la Cruz, and M. L. A. Pérez, Eds., Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Sureste, Mexico City, Mexico, pp. 9–14.
- De la Cruz, T. D. J.** 2008. Nutritional requirements of Poblano chili (*Capsicum annum* L.) and its relationship with yield and fruit quality [Thesis], Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Mexico.
- De, A. K.** 2003. *Capsicum: The Genus Capsicum*, CRC Press, London, UK.
- DeWitt, D. and P. W. Bosland.** 2009. *The Complete Chile Pepper Book: A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving, and Cooking*, Timber Press, Portland, Calif, USA.
- Eissa, H. A., B. E. Mostafa, and A. S. Hussein.** 2007. Capsaicin content and quality characteristics in different local pepper varieties (*Capsicum annum*) and acid-brine pasteurized puree. *Journal of Food Technology*, 5: 246–255, 2007.
- Escobar, J. I.** 1993. Cultivo del pimiento en sustratos en las condiciones del sudeste español, *Cultivo sin Suelo: Hortalizas en Clima Mediterráneo*, C. E. Martínez and L. F. García, Eds., Ediciones de Horticultura, Barcelona, Spain, pp. 109–113.
- Espinosa, R. M.** 2011. Response of Huacle chili (*Capsicum* spp.) to four nutrient solutions in soilless culture under greenhouse conditions [Thesis], Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, Mexico.
- Fattori, V., M. S. N. Hohmann, A. C. Rossaneis, F. A. Pinho-Ribeiro and W. A. Verri.** 2016. Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*, 21: 844.
- Fernández-Bravo, C., N. Urdaneta, W. Silva, H. Poliszuk, and M. Marín.** 2006. Germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Río Grande seeds,

sown in plug trays, using different substrates. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 23: 186–193.

**García-Gaytán, V., S. García-Morales, H. V. Silva-Rojas, L. I. Trejo-Téllez, and F. C. Gómez-Merino.** 2016. First report of powdery mildew in chilhuacle chili (*Capsicum annuum*) caused by *Leveillula taurica* in Southern Mexico. *Plant Disease*, 100: 2325.

**Garza, U. E.** 2001. The Pepper Weevil (*Anthonomus eugenii*) and Its Management on the Huastec Plain, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Ébano, San Luis Potosí, Mexico.

**Govindarajan, V. S. and V. S. Salzer.** 1986. *Capsicum*—production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24: 245–355.

**Granados-Sánchez, D., G. M. A. Hernández, and R. G. F. López.** 2005. Comprehensive Study of the Tehuacán-Cuicatlán Valley: Genetic Resources of Plants, in *Manejo de la Diversidad de los Cultivos en los Agroecosistemas Tradicionales*, J. L. Chávez-Servia, J. Tuxill, and D. I. Jarvis, Eds, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia, pp. 97–109.

**Reveles H. M., L. A. G. Bravo, and C. B. Cabañas.** 2006. Tecnología de Producción de Chile Seco, L. A. G. Bravo, G. G. Galindo, and R. M. D. Amador, Eds., Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Experimental Zacatecas, Zacatecas, Mexico, pp. 45–60.

**Hartz, T. K., M. LeStrange, and D. M. May.** 1993. Nitrogen requirements of drip-irrigated peppers. *HortScience*, 28: 1097–1099.

**Hill, T. A., H. Ashrafi, S. Reyes-Chin-Wo, J. Yao, K. Stoffel, M. J. Truco and A. Van Deynze.** 2013. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene Pepper GeneChip. *PLoS one*, 8: e56200.

**Huber, H., V. Römheld and M. Weinmann.** 2012. Relationship between nutrition, plant diseases and pest. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, P. Marschner, Ed., Academic Press, London, UK, pp. 283–298.



- IPGRI; AVRDC and CATIE. 1995.** Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.), International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación Relativos a los Vegetales, Taipei, Taiwán; Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Jiang L. and K. Kubota. 2004.** Differences in the volatile components and their odor characteristics of green and ripe fruits and dried pericarp of Japanese pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4197–4203.
- Johnson, C. D. and D. R. Decoteau. 1996.** Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeno pepper plant growth, pod yield, and pungency, *HortScience*, 31: 1119–1123.
- Khan, F. A., T. Mahmood, M. Ali, A. Saeed and A. Maalik. 2014.** Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annum* L., *Natural Product Research*, 28: 1267–1274.
- Kothari, S. L., A. Joshi, S. Kachhwaha, and N. Ochoa-Alejo. 2010.** Chilli peppers— a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28: 35–48.
- Kraft, K. H., J. De Jesús Luna-Ruíz, and P. Gepts. 2010.** Different seed selection and conservation practices for fresh market and dried chile farmers in Aguascalientes, Mexico. *Economic Botany*, 64: 318–328, 2010.
- L. A. Bravo, D. F. Mojarro, C. B. Cabañas and H. A. Lara. 2005.** Influence of drip irrigation and fertigation on dry Mirasol chili production in Zacatecas, Mexico,” in *Segunda Convención Mundial del Chile*, Consejo Nacional de Productores, Chiles de Mexico, Mexico, pp. 210–214.
- Langlé, A. L. A. 2011.** Response of Huacle chili (*Capsicum* spp.) to different planting densities and prunings under intensive greenhouse management [Thesis], Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, Mexico.
- Lim, T. K. 2013.** Fruit, Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, T. K. Lim, Ed., Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 161–213.
- Long, T. J. 2011.** The *Capsicum* through Mexican history, *El chile, Protagonista de la Independencia y la Revolución*, T. H. Hernández-Pons and S. A. De Miguel, Eds, Fundación Herdez, Mexico City, Mexico, pp. 7–20.

- López-López P. and G. H. Castro.** 2005. Chilhuacle chili (*Capsicum* sp.): A Typical Chili of the Cañada Region of Oaxaca, Fundación Produce Oaxaca, Oaxaca, Mexico.
- López-López, P. y D. Pérez-Bennetts.** 2015. El Chile Huacle (*Capsicum annuum* sp.) en el Estado de Oaxaca, México. *Agroproductividad*, 8: 35-39.
- López-López, P., R. Rodríguez-Hernández, and E. Bravo Mosqueda.** 2016. Impacto económico del chile Huacle Chile (*Capsicum annum* L.) en el Estado de Oaxaca. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 20: 317–328, 2016.
- MacVeigh, J.** 2008. Mexican cuise, *International Cuisine*, J. MacVeigh, Ed., Delmar Cengage Learning, New York, NY, USA, pp. 325–349.
- Martínez, P. F and D. Roca.** 2011. Substrates for soilless culture. Materials, properties and handling. *Sustrato, Manejo del Clima, Automatización y Control en Sistemas de Cultivo Sin Suelo*, R. V. J. Flórez, Ed., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, pp. 37–77.
- Meckelmann, S. W., D. W. Riegel, M. van Zonneveld, L. Ríos, E. Mueller-Seitz and M. Petz.** 2015. Capsaicinoids, flavonoids, tocopherols, antioxidant capacity and color attributes in 23 native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.) grown in three different locations. *European Food Research and Technology*, 240: 273–283.
- Medina, G. G., C. B. Cabañas, and L. A. Bravo.** 2006. Areas with high potential for chili production, *Tecnología de Producción de Chile Seco*, L. A. G. Bravo, G. G. Galindo, and R. M. D. Amador, Eds., Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Experimental Zacatecas, Zacatecas, Mexico, pp. 177–194.
- Medina-Lara, F., I. Echevarría-Machado, R. Pacheco-Arjona, N. Ruiz-Lau, A. Guzmán-Antonio, and M. Martinez-Estevez.** 2008. Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 43: 1549–1554.
- Mena, C. J.** 2006. Integrated management strategy against pest insects in chili, *Tecnología de Producción de Chile Seco*, L. A. G. Bravo, G. G. Galindo, and R. M. D. Amador, Eds., Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y

Pecuarías, Centro de Investigación Experimental Zacatecas, Zacatecas, Mexico, pp. 97–120.

**Mojarro, D. F., I. A. Bravo, C. B. Cabañas et al.** 2005. Fertilization requirements of Mirasol chili, in five different locations, in the state of Zacatecas, Mexico,” in Segunda Convención Mundial del Chile, Consejo Nacional de Productores de Chiles de México, Tampico, Mexico, pp. 143–148.

**Montes-Hernández, S.** 2010. Compilation and analysis of existing information on the species of the genus *Capsicum* grown and cultivated in Mexico, Informe Final, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Mexico City, Mexico.

**Morán-Bañuelos, S. H. V. H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres, F. Castillo-González, R. M. Soto-Hernández and R. S. Miguel-Chávez.** 2008. Capsaicinoids in Chile pepper landraces of Puebla, Mexico. *Agrociencia*, 42: 807–816.

**Moyer, M.** 2010. How much is left? a graphical accounting of the limits to what one planet can provide, *Scientific American*, 303: 74–81, 2010.

**Nuez, V. F., O. R. Gil, and G. J. Costa.** 2003. Non-virotic diseases, *El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes*, V. F. Nuez, O. R. Gil, and G. J. Costa, Eds., Mundi-Prensa, Mexico City, Mexico, pp. 193–247.

**Orellana-Escobedo, L., L. E. Garcia-Amezquita, G. I. Olivas, J. J. Ornelas-Paz, and D. R. Sepulveda.** 2013. Capsaicinoids content and proximate composition of Mexican chili peppers (*Capsicum* spp.) cultivated in the State of Chihuahua. *CYTA—Journal of Food*, 11: 179–184, 2013.

**Ortega-Martínez, L. D., J. Sánchez-Olarte, R. Díaz-Ruiz, and J. Ocampo-Mendoza.** 2010. Effect of different substrates on tomato seedlings growth (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*, 6: 365–375.

**Pérez-López, H., F. C. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, S. García-Morales, and L. Y. Rivera-Olivares.** 2014. Agricultural lignocellulosic waste and volcanic rock combinations differentially affect seed germination and growth of pepper (*Capsicum annuum* L.). *BioResources*, 9: 3977–3992, 2014.

- Perry, L., and K. V. Flannery.** 2007. Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 11905-11909.
- Perry, L., R. Dickau, S. Zarrillo, I. Holst, D. M. Pearsall, D. R Piperno, and J. S. Raymond.** 2007. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315: 986-988.
- Polak, B.** 2010. Confirmation of chirality of some natural products by the HPLC method, High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, Chromatographic Science Series, CRC Press, pp. 373–396.
- Pruthi, J. S.** 2003. Advances in post-harvest processing technologies of *Capsicum*,” in *Capsicum—The Genus Capsicum*, A. K. De, Ed., Taylor & Francis, London, UK, pp. 175–213.
- Raghavan, S.** 2007. A to Z Spices, Handbook of Spices, Seasoning, and Flavorings, S. Raghavan, Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, pp. 63–185.
- Ramiro, C. A.** 1992. Mirasol or Guajillo Chili in the Plateau of San Luis Potosi, Folleto para Productores no. 13, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Centro de Investigación Regional Noreste, Campo Experimental Palma de la Cruz San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico.
- Reilly, C. A., D. J. Crouch and G. S. Yost.** 2001. Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products, *Journal of Forensic Sciences*, 46: 502–509.
- Reyes, M. J. J.** 2005. Technology Components of Impact in Soledad Chili, Agroproduce, Fundación Produce Oaxaca, Oaxaca, Mexico.
- Rzedowski, J.** 2006. Provincias florísticas de México, Vegetación de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Editorial Limusa, Mexico City, México, 1st edition, pp. 104–121.
- Salazar-Jara, F. I. and P. Juárez-López.** 2013. Macronutritional requirement in chili plants (*Capsicum annum* L.). *Revista Bio Ciencias*, 2: 27–34.

- Salles-Filho, S., C. Gianoni, and P. Jeanne.** 2012. Methodological Guide for the Diagnosis of National Agro-Food Innovation Systems in Latin America and the Caribbean, Innovagro, IICA, San José, Costa Rica.
- Scaldaferro, M. A., A. R. Prina, E. A. Moscone, and J. Kwasniewska.** 2013. Effects of ionizing radiation on *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Solanaceae). *Applied Radiation and Isotopes*, 79: 103-108.
- Seal, D. R. and D. J. Schuster.** 1995. Control of pepper weevil, *Anthonomus eugenii*, in west-central and south Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Soecito*, 108: 220–225.
- SIAP.** 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- SICDE.** 2013. Sistema de información coyuntural de las delegaciones SAGARPA. [http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?from=470&accion=buscar&subrutina=pagina\\_1&column=2&busqueda=&orderBy=Notas.FechaNota&order=ASC&fecha=&notald=80805372450ff098a2dd3d](http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?from=470&accion=buscar&subrutina=pagina_1&column=2&busqueda=&orderBy=Notas.FechaNota&order=ASC&fecha=&notald=80805372450ff098a2dd3d).
- SIOVM** 2011. Information System for Living Modified Organisms, Proyecto GEF-CIBIOGEM/CONABIO, Mexico City, Mexico.
- Steiner, A. A.** 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15: 134–154.
- Steiner, A. A.** 1984. The universal nutrient solution, in *Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture*. *Proceedings International Society for Soilless Culture*, Lunteren, The Netherlands, pp. 1–17.
- Trejo-Téllez, L. I. and F. C. Gómez-Merino.** 2012. Nutrient solutions for hydroponic systems, in *Hydroponics-A Standard Methodology for Plant Biological Researches*, T. Asao, Ed., InTech, Rijeka, Croatia, pp. 1–23.
- UNESCO.** 2010. *Traditional Mexican Cuisine: Ancestral, Ongoing Community Culture*, The United Nations for Education, Science and Culture, Mexico City, Mexico, 2010, <http://www.unesco.org/culture/ich/index.php?RL=00400>.
- Urrestarazu, G. M.** 2015. *Manual práctico del cultivo sin suelo e hidroponía*, *Practical Handbook of Soilless Culture and Hydroponics*, Mundi-Prensa, Madrid, España; Universidad de Almería, Almería, Spain.

- USDA-ARS, 2011.** GRIN species records of Capsicum, National Genetic Resources Program, National Germplasm Resources Laboratory, Maryland, Md, USA.
- Vidal-Zepeda, R.** 2005. Las regiones climáticas de México I.2.2, Temas Selectos de Geografía de México, vol. 10, Instituto de Geografía-UNAM, Mexico City, Mexico.
- Wang, D., and P. W. Bosland.** 2006. The genes of Capsicum. HortScience, 41: 1169-1187.
- Wiesler, F.** 2012. Nutrition and quality, Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, P. Marschner, Ed., Academic Press, Cambridge, UK, pp. 271–282.
- Zachariah, T. J. and P. Gobinath.** 2008. Paprika and chili, Chemistry of Spices, V. A. Parthasarathy, B. Chempakam, and T. J. Zachariah, Eds., CABI, Wallingford, UK, pp. 260–286.

### **CAPÍTULO III.**

### CAPÍTULO III.

## CRECIMIENTO, CONCENTRACIÓN DE NUTRIMENTOS Y CLOROFILAS EN PLÁNTULAS DE CHILE CHILHUACLE EN RESPUESTA A LA RADIACIÓN GAMMA Y EL TIPO DE SUSTRATO

### RESUMEN

Semillas de chile chilhuacle fueron irradiadas con radiación gamma (RG) a dosis de 0, 10, 20, 40, 80, 120 y 160 Gy; después fueron germinadas y evaluadas en tres tipos de sustratos (peat moss (Pm), suelo (Su) y tezontle (Tz)). Se evaluaron los siguientes parámetros a nivel de plántula: lecturas SPAD, altura de plántula (AP), número de hojas (NH), diámetro de tallo (DT), área foliar (AF), volumen radical (VR), biomasa seca de hoja (BSH), biomasa seca de tallo (BST), biomasa seca de raíz (BSR), la concentración de N, P, K, Ca y Mg en tejido foliar, además el contenido de clorofilas *a* y *b*. El experimento se distribuyó completamente al azar con un arreglo factorial: dosis de radiación gamma, tipo de sustrato y su interacción. Las semillas fueron germinadas en cámara de crecimiento, una vez germinadas fueron puestas en invernadero y se le suministró la solución nutritiva de Steiner al 25%. Los resultados demostraron que la RG incrementa de manera significativa las lecturas SPAD, AP y DT. Con el uso del Pm, la AP incrementó 13.08% y 13.73% respecto al Su y Tz. El DT en las plántulas se vio favorecido por el Tz. Con la dosis de 80 Gy, el VR incrementó 17.78% respecto a los valores del tratamiento control, la misma dosis de RG incrementó de manera significativa la BSR. El Pm incrementó el AF de las plántulas 15.64% y 15.41% respecto al Su y Tz. Sólo la concentración de N en tejido foliar fue significativo y dependiente con 120 Gy. La concentración de P en tejido foliar se vio favorecido por el Pm. Las concentraciones más altas K y Ca en tejido foliar se encontraron al utilizar suelo. El contenido de clorofilas *a* y *b* se vieron reducidas al utilizar RG en todos los tratamiento. El suelo influyó en el mayor contenido de clorofilas *b* en las plántulas de chile. La interacción de los factores de estudio no mostró diferencias significativas en las variables BST, concentración de P, K, Ca y Mg.



**Palabras clave:** chile chilhuacle, radiación gamma, sustrato, crecimiento, macronutrientes

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los chiles y pimientos pertenecen al género *Capsicum* (familia Solanaceae), el cual representa uno de los grupos de especies más diversas y cultivadas en el mundo. *Capsicum* es nativa de América tropical y subtropical, siendo Bolivia, Brasil y México los países que concentran la mayor parte de la diversidad genética. Este género comprende más de 30 especies, siendo *C. annuum* la especie más cultivadas y de importancia económica en el mundo (Perry y Flannery, 2007; Aguilar-Rincón *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2010; Wang y Bosland, 2006; USDA-ARS, 2011). Los pimientos cultivados varían en tamaño, forma, pungencia y color, pero a menudo carecen de rasgos de resistencia a plagas, enfermedades y rendimiento (Naegele *et al.*, 2016)

El chile chilhuacle es una variedad mexicana y es valioso por ser un ingrediente principal del mole negro oaxaqueño, se cultiva bajo sistemas agrícolas tradicionales, donde una serie de limitaciones agronómicas asociadas con el proceso de producción, así como la incidencia y severidad de plagas y enfermedades representan limitaciones significativas que restringen el potencial de rendimiento, además la base genética está muy restringida y se encuentra en peligro de extinción (García-Gaytán *et al.*, 2017).

Los caracteres deseados se pueden inducir con éxito a través de mutaciones, con alto valor práctico en programas de mejora de plantas de interés agronómico (Fahad y Salim, 2009). Las mutaciones inducidas en plantas por medio de la radiación han sido ampliamente estudiadas en programas de mejoramiento genético (Shirley *et al.*, 1992). Dichas mutaciones tienen amplias aplicaciones en plantas, no sólo en las investigaciones de genética básica, sino también, en los programas de fitomejoramiento (Scaldaferro *et al.*, 2013). Estudios de mutaciones inducidas experimentalmente tuvieron éxito en los principales cultivos (trigo, arroz, cebada, algodón, maní y frijoles) que se propagan por semillas. Más de 1,800 cultivares obtenidos ya sea como mutantes directos o derivados de sus cruces han sido liberados en todo el mundo en 50 países (Ahloowalia y Maluszynski, 2001). Además se han desarrollado mutantes para la forma y color de la flor de crisantemo (Barakat *et al.*,

2010), cambios importantes en gerbera como el diámetro, color de flor y floración temprana (Ghani *et al.*, 2013), líneas de garbanzo tolerantes a la congelación (Keykha *et al.*, 2011), fueron mejorados los caracteres vegetativos en papa (Hamideldin y Hussien, 2013). La radiación gamma mejoró el número de raíces y longitud de trigo duro en 18 y 32% con una dosis de 20 Gy (Melki y Marouani, 2010), por tanto, radiaciones a dosis bajas en plántulas de trigo estimula su crecimiento (Grover y Khan, 2014). En lechuga la radiación baja (30 Gy) estimuló el crecimiento y desarrollo de plantas, así como pigmentos asimilativos (Marcu *et al.*, 2013). La radiación gamma es una tecnología con inmensas aplicaciones en la agricultura, medicina y la industria. Su potencial de explotación en la agricultura se limita principalmente por falta de información y conocimiento (Piri *et al.*, 2011). Se ha observado que tanto en semilla y plántulas de pimientos la irradiación puede inhibir o estimula el crecimiento, incrementar la resistencia por daños causados por radiación UV-B y altas intensidades de luz, alteración en la fotosíntesis y modulación en el sistema antioxidante (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). En *C. annuum* y *C. frutescens* se observaron incrementos en el número de frutos por planta y después el número de semillas por fruto cuando estos se irradiaron con neutrones rápidos (Falusi *et al.*, 2012). Los sustratos utilizados en este experimento fueron el peat moss, suelo y tezontle. En México se empezaron a utilizar sustratos de importación muy eficientes pero con inconvenientes, como lo es su adquisición y altos costos como es el caso de al agrolita, la lana de roca, perlita y peat moss. Por tal motivo, dada la situación económica y el desconocimiento en el manejo por los productores, se hace necesario alternativas de sustratos que no implique, altos costos y de fácil manejo como el tezontle (Velasco-Hernández *et al.*, 2004). En la región de Oaxaca la mayoría de los productores, para germinar sus semillas de chiles, utilizan almácigos de sus parcelas de siembra. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de radiación gamma con  $Co^{60}$  y tres tipos de sustratos (peat moss, suelo y tezontle) en el crecimiento, concentración de N, P, K, Ca y Mg en tejido foliar, y contenido de pigmentos fotosintéticos, en plántulas de chile chilhuacle.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Material biológico**

Se utilizaron lotes de 100 semillas de chile chilhuacle por tratamiento. Las semillas fueron seleccionadas de los frutos usando el criterio de uniformidad, mayor tamaño, color y libres daños con los productores locales. Los frutos de chile chilhuacle fueron colectados en la Región Cañada en el estado de Oaxaca, México único lugar en el mundo donde se produce.

### **3.2.2. Radiación de semillas**

Semillas de chile chilhuacle fueron retiradas de la placenta del frutos deshidratados, posteriormente las semillas fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 20 min, seguido de lavado con agua estéril para eliminar el residuo de hipoclorito. Lotes de 100 semillas previamente etiquetadas, se irradiaron en un irradiador Transelektro LGI-01 con el isótopo  $\text{Co}^{60}$  a dosis de 0, 10, 20, 40, 80 y 120 Gy, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), ubicado en La Marquesa, municipio de Ocoyoacac, Estado de México.

### **3.2.3. Sustratos**

Se evaluaron tres diferentes tipos de sustratos; peat moss, suelo agrícola de la Región Cañada y roca volcánica conocida localmente como tezontle con partículas de 5 mm de diámetro. Los sustratos se coloraron en bandejas de poliestireno con 128 cavidades, en los que las semillas se sembraron a profundidad de 1 cm. El riego se aplicó diario a saturación, con agua.

### **3.2.4. Proceso de germinación**

Una vez sembrada las semillas en las bandejas de poliestireno con los respectivos sustratos se mantuvieron en una cámara de germinación automática Shel Lab LI15 durante 15 días, a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 10 h con riego diario. Una vez iniciada la germinación las bandejas fueron trasladadas a un invernadero para evitar la etiolación de plántulas. Las condiciones de cultivo fueron de 30.5 °C la temperatura máxima y la mínima de 15°C con humedad relativa de 70%.

### **3.2.5. Variables evaluadas**

#### **3.2.5.1. Densidad aparente (DA), densidad real (DR) y porosidad total (PT)**

Se calculó para cada uno de los sustratos utilizados la densidad aparente (DA), la densidad real (DR) y la porosidad total (PT) de acuerdo a los protocolos de (Martínez y Roca 2011).

#### **3.2.5.2. pH y conductividad eléctrica (CE)**

Los valores de pH y la CE fueron determinados con el método de extracto de la pasta de saturación (Warncke, 1986). En los tres sustratos empleados se utilizó agua destilada como agente de extracción y agitación hasta alcanzar un punto de humedad característico en la superficie del sustrato. Para determinar las lecturas de pH se utilizó un potenciómetro OAKTON pH/mV °C meter, Series No: 43291. La CE se midió con un medidor de conductividad de mesa (Hanna, Mod. HI 4312).

#### **3.2.5.3. Iones solubles**

Los iones en solución (P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, B y Na) del extracto de la pasta de saturación se determinaron por medio de plasma acoplado inductivamente por espectrometría de emisión atómica (ICP-VARIAN equipment, model 725-ES). Para determinar el contenido de nitrógeno se estimó mediante el método de micro-Kjeldaghl.

#### **3.2.5.4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)**

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) en aquellos sustratos con pH por debajo de 7 se determinó utilizando el método de acetato de amonio modificado ( $\text{NH}_4\text{OAc}$  1 N, pH 7.0). Mientras que aquellos sustratos con valores de pH por arriba de 7, el CIC se determinó con el método de acetato de sodio ( $\text{NaOAc}$  1 N pH 8.2). En los extractos resultantes, se determinó también el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  intercambiable.

#### **3.2.5.5. Lecturas SPAD y parámetros de crecimiento**

A los 52 días después de la siembra se tomaron lecturas SPAD con un medidor portátil de clorofila Minolta-502, se realizaron tres lecturas por plántula en hojas

recientemente maduras. La altura de plántulas se midió con una regla graduada de la base del tallo al ápice. La unidad de medición fue en (cm). Se realizó además, conteo directo del número de hojas por plántula. El diámetro de tallo se midió con un vernier digital milimétrico, colocando éste en la parte basal de tallo, la unidad de medición se presenta en (mm). Se midió el área foliar, mediante método destructivo de plántulas, con el uso de un integrador electrónico de área foliar LICOR LI-300, reportándose en (cm<sup>2</sup>). Para determinar el volumen de raíz se usó el método de desplazamiento con probetas de plástico de 10 mL usando agua destilada. La determinación de biomasa seca de hoja, tallo y raíz fue mediante un horno de aire forzado (Riossa, HCF-125D, México) durante 72 h a una temperatura de 70 °C y hasta peso constante del material vegetal, el pesado de la biomasa seca (g) se realizó en una balanza analítica.

### **3.2.6. Análisis de nutrientes minerales y contenido de clorofila**

La concentración de nutrimentos fueron realizados en hojas de chile chilhuacle. La concentración de N total se determinó con el método Semimicro-Kjeldhal ([Bremner, 1965](#)), utilizando una mezcla catalizadora, adicionando ácido sulfúrico-salicílico para su digestión. La determinación de concentraciones de P, K, Ca, y Mg se realizó mediante el método de digestión húmeda adicionando ácido perclórico y nítrico ([Alcántar y Sandoval, 1999](#)). Los digestados obtenidos una vez filtrados se leyeron en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-VARIAN 725-ES). La determinación foliar de clorofila *a* y *b* fue mediante tejido foliar congelado a -80 °C, y bajo la metodología de extracción etanólica ([Geiger et al., 1998](#)). Se cortaron trozos pequeños de hojas y pesaron 20 mg por triplicado. Se colocaron en moteros fríos y se agregó 500 µL de etanol al 80% y se maceró. El material macerado se colocó en tubos de reacción (Eppendorf). Las extracción etanólica se realizó incubando las muestras en baño maría durante 20 min a 80°C; agregando 300 µL de etanol al 80%, 500 µL de etanol al 50% y 850 µL de etanol al 98%, respectivamente. La separación de fases se realizó por centrifugación (14,000 rpm por 5min), y los sobrenadantes obtenidos se juntaron para los análisis en un espectrofotómetro (Spectrophotometer, Jenway 67 UV/VIS.) a longitudes de onda de

645 y 665 nm, los resultados se reportan en  $\text{mg g}^{-1}$  en base a peso de biomasa fresca (PBF).

### **3.2.7. Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico**

Se realizó un diseño de tratamientos factorial ( $7 \times 3$ ) donde el primer factor de estudio fue la dosis de radiación gamma con  $\text{Co}^{60}$  y el segundo el tipo de sustrato. Las dosis de radiación se aplicó en: 10, 20, 40, 80, 120 y 160 Gy, y el factor sustrato fue: peat moss, suelo y tezontle. Los 21 tratamientos fueron distribuidos en un invernadero en un diseño de parcelas divididas donde la parcela grande fueron las dosis y la parcela pequeña fueron los sustratos. Las unidades experimentales se componían de las plántulas germinadas en las cavidades de las bandejas de poliestireno. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza de acuerdo con los tratamientos y diseños experimentales usados. Para este propósito, se utilizó el software SAS versión 9.3 (SAS, 2011) y la prueba de comparación de media de (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

## **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.3.1. Densidad aparente (DA), densidad real (DR) y porosidad total (PT)**

Los resultados de la caracterización física de los tres sustratos empleados en el experimento se observan en el (Cuadro 1). La PT, fue mayor en el sustrato peat moss (90%), que en el tezontle (59%), y el suelo (48%). De acuerdo con Martínez y Roca (2011) la porosidad total de un sustrato debe estar en un rango  $> 85\%$ , sin embargo, dependerá del tipo de material y origen. De acuerdo con Burés (1997) la turba puede estar en un rango de 94.44%, y la grava volcánica 70.94%. Cabrera (1999) menciona que la porosidad total de un sustrato ideal puede estar en un rango de 70 y 85%. En el tezontle la DA, presentó los valores más altos ( $2.82 \text{ g cm}^3$ ) con respecto al suelo y peat moss ( $2.50$  y  $1.47 \text{ g cm}^3$ ). Mientras que la DR, los valores más altos correspondieron para el suelo ( $1.29 \text{ g cm}^3$  respectivamente). La DA se considera óptimo en rangos que van de  $0.50$  y  $0.75 \text{ g cm}^3$  y la DR en materiales orgánicos y minerales de  $1.45$ ,  $2.56 \text{ g cm}^3$  (Martínez y Roca, 2011).

**Cuadro 1.** Porosidad total, densidad aparente y densidad real de los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle (*C. annuum* L.).

Sustrato	Densidad aparente (DA; g cm <sup>3</sup> )	Densidad real (DR; g cm <sup>3</sup> )	Porosidad total (PT; %)
Peat moss	1.47	0.15	90
Suelo	2.50	1.29	48
Tezontle	2.82	1.15	59

### 3.3.2. pH y conductividad eléctrica (CE)

El pH y la CE en los tres sustratos empleados se observan en el Cuadro 2, en general el pH de las turbas son ácidos, valores semejantes de pH 7.6 en suelo reportó [Arredondo et al. \(2008\)](#) en la producción de tomate. Los valores de pH en tezontle fue de 8.55 y la CE de 0.077 dS m<sup>-1</sup>. [Martínez y Roca \(2011\)](#) menciona que el tezontle tiene un pH de neutro a ligeramente alcalino, muy baja CIC, sin embargo, sus propiedades físicas dependen en gran medida del tamaño de las partículas.

**Cuadro 2.** Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) en los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle.

Sustrato	pH	CE (ds m <sup>-1</sup> )
Peat moss	4.33	0.583
Suelo	7.98	0.338
Tezontle	8.55	0.077

### 3.3.3. Iones solubles

Los valores en la concentración de macronutrientes, micronutrientes y sodio en los tres sustratos utilizados se presentan en el (Cuadro 3). La concentración de N fueron bajos en los sustratos empleados, el P no se detectó en el suelo proveniente de la Región Cañada, los valores de K, Ca y Mg fueron altos en peat moss 0.712 y 0.164 g kg<sup>-1</sup>. Para los micronutrientes (Fe, Zn, Mn y B) se observaron concentraciones superiores en peat moss que en suelo y tezontle. El elemento Na menores en el suelo y tezontle, mientras que en peat moss este elemento fue de 10.766 mg kg<sup>-1</sup>.

**Cuadro 3.** Concentración de nutrientes en el extracto de la pasta de saturación en los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle.

Sustratos	N	P	K	Ca	Mg
	(%)		g kg <sup>-1</sup>		
Peat moss	0.891	0.060	0.021	0.712	0.164
Suelo	0.100	nd	0.002	0.066	0.015
Tezontle	0.027	0.173	0.001	0.007	0.004
Sustratos	Fe	Zn	Mn	B	Na
			mg kg <sup>-1</sup>		
Peat moss	2.159	2.709	3.436	1.049	10.766
Suelo	0.095	0.071	0.01	0.112	6.61
Tezontle	0.009	0.086	nd	0.136	2.001

N = nitrógeno, P = fósforo, K = potasio, Ca = calcio, Mg = magnesio, Fe = hierro, Zn = zinc, Mn = manganeso, B = boro, Na = sodio, nd = no detectado.

### 3.3.4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

En el Cuadro 4 se observan los valores de los cationes intercambiables y la capacidad de intercambio catiónico CIC. La CIC fue mayor en el suelo 66.31 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> que en tezontle y peat moss. El intercambio de cationes y aniones en los suelos se produce en la superficie mineral de las arcillas, compuestos orgánicos, materia orgánica y raíz. La CIC es una propiedad química importante del suelo, pues influyen en la disponibilidad y retención de nutrientes de este. Representa la cantidad total de carga (-) superficial en minerales y materia orgánica para atraer cationes en la solución (Beaton y Nelson, 2005).

**Cuadro 4.** Cationes intercambiables y capacidad de intercambio catiónico (CIC) en los sustratos utilizados en la germinación del chile chilhuacle.

Sustratos	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	CIC
			cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>		
Peat moss	0.066	22.500	6.500	0.896	29.96
Suelo	0.236	49.000	15.500	1.585	66.31
Tezontle	0.018	2.00	1.000	0.396	3.415

K<sup>+</sup> = potasio, Ca<sup>2+</sup> = calcio, Mg<sup>2+</sup> = magnesio, Na<sup>+</sup> = sodio, CIC = capacidad de intercambio catiónico.



En Cuadro 5 se muestran los resultados del análisis de varianza de los factores de estudio, dosis de RG, tipo de sustrato y su interacción (dosis x sustrato), para las variables de estudio. Hubo diferencias significativas para todas las variables, excepto para biomasa seca de hoja y tallo.

En tanto que por efecto de la interacción (dosis x sustrato), las diferencias no fueron significativas ( $p \leq 0.05$ ) para la biomasa seca de raíz, concentración de P, K, Ca y Mg en tejido foliar; para el resto de las variables los efectos fueron significativos.

**Cuadro 5.** Efecto de los factores de estudio dosis de radiación, sustrato y su interacción en cada una de las variables evaluadas.

Variables	Fuente de variación		
	Dosis (Gy)	Sustrato	Dosis x Sustrato
Grados de libertad	6	2	12
Lecturas SPAD	*	**	*
Altura de planta	**	**	**
Número de hojas	**	**	**
Diámetro de tallo	**	*	**
Área foliar	*	**	**
Volumen radical	**	**	**
Biomasa seca de hoja	ns	ns	*
Biomasa seca de tallo	ns	ns	Ns
Biomasa seca de raíz	*	**	**

Variables	Fuente de variación		
	Dosis (Gy)	Sustrato	Dosis x Sustrato
Grados de libertad	6	2	12
Concentración de N en hoja	*	ns	**
Concentración de P en hoja	ns	**	Ns
Concentración de K en hoja	ns	*	Ns
Concentración de Ca en hoja	ns	**	Ns
Concentración de Mg en hoja	**	*	Ns

Contenido de clorofila a	**	ns	**
Contenido de clorofila b	**	*	**

ns = no significativo; \* = significativo al 5%; \*\* = significativo al 1%

### 3.3.5. Radiación gamma en variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle

Con las dosis de radiación gamma 120, 80 y 40 Gy se incrementó de manera significativa las lecturas SPAD, AP y DT en un 5.87%, 13.89% y 1.78% respectivamente (Cuadro 6). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el NH, el cual mostró valores parecidos entre el tratamiento sin irradiar y el tratamiento con la mayor dosis de RG. Con el uso de la radiación gamma se ha observado su efecto estimulante en variables de crecimiento en plántulas de pimiento como el diámetro de tallo, y área foliar (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Otros aspectos morfológicos como la longitud de brotes, número de raíces, longitud de raíces y biomasa seca en vid son estimulados por la RG (Charbaji y Nabulsi, 1999).

**Cuadro 6.** Efecto del nivel de radiación sobre variables de crecimiento de plántulas de chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	Lecturas SPAD	AP (cm)	NH	DT (mm)
0	36.41 ±3.99 c	9.36 ±1.98 dc	7.35±0.98 a	1.66±0.29 ab
10	35.98 ±7.87 c	8.89 ±2.47 d	6.77±1.4 bc	1.54±0.31 bc
20	37.23 ±3.91 abc	10.49 ±1.26 ab	7.04±1.24 ab	1.63±0.27 abc
40	37.31 ±4.74 abc	9.88 ±1.45 bc	6.84±1.14 abc	1.69±0.25 a
80	36.64 ±3.85 abc	10.87 ±1.72 a	6.56±1.12 bc	1.59±0.25 abc
120	38.68 ±3.81 a	10.06 ±1.48 b	6.47±1.16 c	1.51±0.25 c
160	38.21 ±3.96 ab	10.14 ±1.40 b	7.31±1.12 a	1.56±0.26 bc

Gy = gray; AP = altura de plántula; NH = número de hojas; DT = diámetro de tallo. Medias con letras distintas en columnas son estadísticamente diferente (Tukey, 0.05).

Nuestro trabajo demuestra que las características de crecimiento en las plántulas de chile chilhuacle después de la RG pueden utilizarse para futuros estudios sobre resistencia a estrés biótico y abiótico. Debido a que las plantas son organismos

sésiles y constantemente están expuestas a diversos tipos de estímulos ambientales (Prasch y Sonnewald, 2015). El estrés térmico y la sequía por ejemplo, reducen significativamente el crecimiento de las plantas (Vile *et al.*, 2012), en cebada se observan reducción en el crecimiento (Rollins *et al.*, 2013). La sequía reduce significativamente la biomasa y altura de planta (Suzuki *et al.*, 2014). En genotipos de garbanzo fue posible inducir la resistencia al estrés por congelación con la dosis de radiación de 180 y 140 Gy (Keykha *et al.*, 2011). Las variables de crecimiento como las observadas en el Cuadro 6, se han utilizado en los programas de mejoramiento en diversos cultivos (Borzouei *et al.*, 2010; Albokari, 2014). El uso de la radiación en los sistemas biológicos ha contribuido a la sociedad en diversas aplicaciones como en la medicina, agricultura, productos farmacéuticos y avances tecnológico (Jan *et al.*, 2012).

Los niveles de radiación no tuvieron efectos significativos en los parámetros de crecimiento como: AF, BSH y BST. El VR se incrementó 28.36% con 80 Gy, respecto al tratamiento de 20 Gy, y de un 26.87% respecto al tratamiento con 120 Gy; con la dosis de RG de 120 Gy hubo efectos significativos en la variable BSR (Cuadro 7). Investigaciones en trigo (*Triticum durum* Desf.) observaron que una RG de 20 Gy, mejoró la longitud y número de raíces 32 y 75%, y cuyo potencial puede ser de utilidad en condiciones de sequía (Melki y Marouani, 2010). Un incremento en el VR puede utilizarse como criterio para estimar la calidad de las plantas y predecir su comportamiento en campo una vez plantada (Alzugaray *et al.*, 2004). Entre otros aspectos el VR, puede ser considerado como índice de calidad morfológica, debido a que las raíces pueden presentar mayor suministro y absorción de nutrientes, así como aumento en el crecimiento (Haase y Rose, 1994). Una planta durante el establecimiento en campo sufre cierto grado de estrés, para minimizar el daño dependerá de factores tales como la distribución y tamaño del sistema radical (Grossnickle, 2005).

**Cuadro 7.** Efecto del nivel de radiación sobre variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	AF (cm <sup>2</sup> )	VR (cm <sup>3</sup> )	BSH (g)	BST (g)	BSR (g)
0	14.08±4.10 a	0.55±0.31 ab	0.05±0.07 a	0.03±0.01 a	0.027±0.01 ab
10	11.18±5.77 b	0.52±0.38 b	0.04±0.02 a	0.03±0.01 a	0.022±0.01 ab
20	13.52±4.26 a	0.48±0.31 b	0.04±0.01 a	0.03±0.01 a	0.026±0.01 b
40	13.83±4.47 a	0.59±0.32 ab	0.04±0.01 a	0.04±0.01 a	0.027±0.01 ab
80	13.22±4.00 a	0.67±0.39 a	0.05±0.06 a	0.03±0.01 a	0.029±0.01 a
120	12.62±4.34 ab	0.49±0.36 b	0.04±0.01 a	0.03±0.01 a	0.025±0.01 ab
160	13.52±4.31 a	0.52±0.30 b	0.04±0.01 a	0.36±2.84 a	0.026±0.01 ab

Gy = gray; AF = área foliar; VR = volumen radical; BSH = biomasa seca de hoja; BST = biomasa seca de tallo; BSR = biomasa seca de raíz. Valores con letras distintas en columnas, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

### 3.3.6. Efecto de sustratos en variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle

Se observaron diferentes respuestas en las variables de crecimiento del chile chilhuacle por efecto del tipo de sustrato (Cuadro 8). Con el uso del tezontle se obtuvo diferencias significativas en las lecturas SPAD y DT. La mayor AP se obtuvo cuando las semillas fueron sembradas en peat moss, con incrementos de 13.08% y 13.73% respecto al suelo y tezontle. El análisis estadístico mostró que las medias más altas en el NH fueron tanto en peat moss y tezontle. Con el uso del tezontle se incrementó de manera significativa el DT. Características como mayor la altura de plantas, número de hojas y diámetro de tallo, indican vigor para ayudar a reducir la pérdida de plantas después del trasplante. Estudios realizados por [Ortega-Ramírez et al. \(2010\)](#) observaron que la mayor altura, diámetro y número de hojas en plántulas de *Lycopersicum esculentum* Mill se obtuvo con turba que en suelo. El conjunto de buenas propiedades físicas, químicas y biológicas (presencia de hormonas y sustancias húmicas) de las turbas es la casusa de su amplia utilización ([Martínez y Roca, 2011](#)). Comparativamente el tezontle podría funcionar como sustrato alternativo para el cultivo de chile chilhuacle, ya que afecta positivamente indicadores de crecimiento en las plántulas.

**Cuadro 8.** Efecto del tipo de sustrato sobre variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle

Sustrato	Lecturas SPAD	AP (cm)	NH	DT (mm)
Peat moss	35.22 ±3.45 c	10.93±1.26 a	7.17±1.17 a	1.59±0.24 ab
Suelo	37.48±5.22 b	9.50±2.28 b	6.48±1.17 b	1.56±0.27 b
Tezontle	38.97±4.92 a	9.43±1.32 b	7.06±1.21 a	1.63±0.30 a

AP = Altura de plántula; NH = Número de hojas; DT = diámetro de tallo. Medias con letras distintas en columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

El AF, VR y BSR de plántulas se encontraron efectos significativos ( $p \leq 0.01$ ) por efecto del tipo de sustrato (Cuadro 9). El peat moss incrementó significativa el AF (16.64% y 15.41%), el VR (39% y 62%) y la BSR (33.33% y 66.67%) de plántulas, respecto al suelo y tezontle respectivamente. Nuestros resultados son similares a los reportados por [Ameri et al. \(2012\)](#) donde la mayor área foliar y peso seco de raíz fueron con las mezclas de sustratos que contenían turba.

De acuerdo de [Haase y Rose \(1994\)](#) plántulas con volumen de raíz alta sugiere un aumento en la biomasa de raíz por unidad de superficie del suelo lo que da una mayor utilización de los nutrimentos, suministro, absorción y almacenamiento. Así mismo, las propiedades físicas y químicas de un sustrato juegan un papel importante en el desarrollo y funcionamiento de las raíces, pues están directamente ligados a la condiciones de aireación y contenido de agua, además de tener una influencia directa sobre el suministro de nutrimentos para el desarrollo de la especie en estudio ([García et al., 2001](#)). Al analizar el extracto de la pasta de saturación del peat moss, se observó mayor concentración de macro y micronutrimentos con respecto a suelo y tezontle.

**Cuadro 9.** Efecto principal del sustrato en variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.

<b>Sustrato</b>	<b>AF (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>VR (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>BSH (g)</b>	<b>BST (g)</b>	<b>BSR (g)</b>
Peat moss	14.54±4.54 a	0.82±0.36 a	0.05±0.04 a	0.17±1.86 a	0.03±0.01 a
Suelo	12.12±4.58 b	0.50±0.27 b	0.04±0.05 a	0.03±0.01 a	0.02±0.01 b
Tezontle	12.30±3.99 b	0.31±0.14 c	0.04±0.01 a	0.03±0.01 a	0.01±0.01 c

AF = área foliar; VR = volumen radical; BSH = biomasa seca de hoja; BST = biomasa seca de tallo; BSR = biomasa seca de raíz. Valores con letras distintas en columnas, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Los resultados de la interacción RG x tipo de sustrato para las variables lecturas SPAD, AP, NH y DT se observan en el Cuadro 10. Con la RG de 120 Gy y con tezontle se incrementó los valores en las lecturas SPAD ( $p \leq 0.05$ ). Así mismo hubo diferencias altamente significativas en la AP ( $p \leq 0.01$ ) con el uso de la GR de 80 Gy y con el uso del suelo. No hubo efectos significativos en las variables NH y DT.

Para los valores en la interacción RG x tipo de sustrato. Hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) para las variables AF, con la dosis de 10 Gy y con peat moss. En tanto, que el mayor incremento del VR, se observó cuando la RG fue de 80 Gy y peat moss. En las variables BSH y BST no hubo diferencias significativas. El valor de variable BST, presentó diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) cuando las semillas fueron irradiadas con 20 Gy y con el uso de peat moss (Cuadro 11).

**Cuadro 10.** Efecto de la interacción RG x sustrato sobre las variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.

<b>Dosis (Gy)</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Lecturas SPAD</b>	<b>AP (cm)</b>	<b>NH</b>	<b>DT (mm)</b>
0	Peat moss	33.45±2.38 g	10.78±1.95 abcd	7.19±1.02 abcd	1.52±0.22 cdef
0	Suelo	35.83±3.43 cdefg	7.40±0.89 g	7.12±1.09 abcd	1.62±0.25 abcde
0	Tezontle	39.93±3.04 abc	9.83±1.08 cdef	7.73±0.72 a	1.84±0.31 a
10	Peat moss	37.24±2.66 bcdefg	11.10±0.85 abc	7.48±1.12 ab	1.80±0.16 ab
10	Suelo	34.21±10.27 fg	5.99±1.71 h	5.56±1.41 g	1.27±0.23 f
10	Tezontle	36.50±8.55 bcdefg	9.59±0.94 def	7.28±1.10 abc	1.55±0.28 bcde
20	Peat moss	34.90±4.40 defg	11.08±1.02 abc	7.36±1.11 abc	1.65±0.22 abcde
20	Suelo	38.72±2.81 abcd	10.52±1.02 bcd	6.20±0.76 defg	1.59±0.22 abcde
20	Tezontle	38.06±3.35 abcdef	9.88±1.45 cdef	7.56±1.35 a	1.65±0.35 abcde
40	Peat moss	34.49±4.32 defg	4.08±10.79 abcd	7.53±1.02 ab	1.70±0.19 abcde
40	Suelo	38.88±4.74 abcd	9.68±1.28 def	6.48±0.91 bcdefg	1.63±0.29 abcde
40	Tezontle	38.70±3.88 abcde	9.14±1.41 ef	6.48±1.15 bcdefg	1.74±0.25 abcd
80	Peat moss	34.26±2.17 efg	11.51±0.95 ab	7.11±1.10 abcd	1.47±0.23 ef
80	Suelo	38.01±2.84 abcdef	12.01±0.82 a	6.80±1.08 abcdef	1.75±0.17 abc
80	Tezontle	37.75±4.90 abcdefg	9.08±1.59 ef	5.76±0.66 fg	1.54±0.25 cde
120	Peat moss	36.72±3.38 bcdef	10.67±1.26 bcd	5.92±0.99 efg	1.52±0.25 cde
120	Suelo	37.93±3.38 abcdef	10.73±0.94 bcd	6.34±0.89 cdefg	1.51±0.29 cdef
120	Tezontle	41.43±3.10 a	8.74±1.30 f	7.16±1.24 abcd	1.50±0.19 cdef
160	Peat moss	35.60±2.79 cdefg	10.59±1.15 bcd	7.57±1.10 a	1.49±0.24 def
160	Suelo	38.69±3.53 abcde	10.06±1.78 cde	6.88±1.30 abcde	1.57±0.20 bcde
160	Tezontle	40.42±3.98 ab	9.75±1.06 def	7.48±0.82 ab	1.60±0.34 abcde

AP = Altura de plántula, NH = Número de hojas, DT = diámetro de tallo. Medias con letras distintas son estadísticamente diferente (Tukey, 0.05).

**Cuadro 11.** Efecto de la interacción RG x sustrato sobre las variables de crecimiento en plántulas de chile chilhuacle.

<b>Dosis (Gy)</b>	<b>Sustrato</b>	<b>AF (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>VR (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>BSH (g)</b>	<b>BST (g)</b>	<b>BSR (g)</b>
0	Peat moss	14.77±3.89 abcd	0.82±0.35 abc	0.046±0.01 ab	0.03±0.00 a	0.03±0.01 abcde
0	Suelo	14.36±4.72 abcd	0.48±0.19 defg	0.071±0.12 a	0.04±0.00 a	0.023±0.00 defgh
0	Tezontle	13.13±3.63 abcd	0.36±0.16 efg	0.047±0.01 ab	0.03±0.00 a	0.028±0.01 bcdefg
10	Peat moss	16.31±5.83 a	0.90±0.41 ab	0.055±0.02 ab	0.04±0.01 a	0.036±0.01 abc
10	Suelo	6.45±2.56 e	0.33±0.18 fg	0.02±0.01 b	0.01±0.00 a	0.016±0.00 h
10	Tezontle	10.79±3.38 d	0.31±0.13 g	0.038±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.014±0.00 h
20	Peat moss	15.60±4.90 ab	0.82±0.31 abc	0.047±0.01 ab	0.04±0.01 a	0.039±0.01 a
20	Suelo	11.21±2.75 cd	0.32±0.13 g	0.038±0.00 ab	0.03±0.00 a	0.018±0.00 fgh
20	Tezontle	13.74±3.79 abcd	0.30±0.11 g	0.050±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.021±0.01 efgh
40	Peat moss	15.89±4.08 ab	0.78±0.38 abc	0.054±0.01 ab	0.04±0.01 a	0.033±0.01 abcd
40	Suelo	12.53±4.05 abcd	0.60±0.25 cde	0.046±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.028±0.01 abcdef
40	Tezontle	12.97±4.65 abcd	0.39±0.18 efg	0.048±0.02 ab	0.04±0.01 a	0.020±0.01 efgh
80	Peat moss	13.99±3.15 abcd	0.97±0.34 a	0.072±0.11 a	0.03±0.01 a	0.03±0.01 ab
80	Suelo	14.96±4.34 abc	0.57±0.26 abc	0.047±0.01 ab	0.04±0.00 a	0.037±0.01 ab
80	Tezontle	10.69±3.23 d	0.28±0.15 g	0.040±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.017±0.00 fgh
120	Peat moss	13.81±4.30 abcd	0.88±0.36 ab	0.044±0.01 ab	0.03±0.00 a	0.03±0.01 abcd
120	Suelo	11.98±3.51 bcd	0.35±0.15 efg	0.040±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.024±0.00 cdefgh
120	Tezontle	12.11±5.03 bcd	0.23±0.08 g	0.044±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.01±0.01 gh
160	Peat moss	14.56±5.08 abcd	0.58±0.28 cdef	0.045±0.01 ab	0.99±4.89 a	0.028±0.01 abcdefg
160	Suelo	13.31±4.32 abcd	0.68±0.31 abc	0.046±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.03±0.01 abcde
160	Tezontle	12.66±3.24 abcd	0.29±0.09 abcd g	0.042±0.01 ab	0.03±0.01 a	0.018±0.00 fgh

AP = Altura de plántula, NH = Número de hojas, DT = diámetro de tallo. Medias con letras distintas son estadísticamente diferente (Tukey, 0.05).



### 3.3.7. Análisis de nutrientes minerales y contenido de clorofila

Los valores en la concentración de macronutrientes en tejido foliar se observa en el Cuadro 12. Hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para la concentración de N en tejido foliar. Se presenta una relación positiva entre concentración foliar de N y el nivel de irradiación con 120 Gy respecto al tratamiento con 10 y 20 Gy. Las plantas semillas irradiadas con 120 Gy presentó una mayor concentración de N foliar, en un 30% respecto al tratamiento de 10 Gy. No hubo diferencias significativas para la concentración foliar de P, K y Ca por efecto de la RG. En el caso de la concentración de Mg, hubo un ligero incremento cuando la dosis fue de 80 Gy, pues fue superior en un 20% respecto al tratamiento de 10 Gy. La RG en semillas favoreció la concentración de N en especies de plantas como *Onobrychis viciifolia* Scop con la dosis de radiación de 90 Gy (Mohajer *et al.*, 2014). La irradiación de semillas en *Cicer arietinum* L. con la dosis de radiación gamma de 0.15 y 0.20 kGy se incrementó la concentración de K, P, Ca, S, Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Rb, Sr y Cl se incrementaron (Maity *et al.*, 2010).

**Cuadro 12.** Concentración macronutrientes en hojas de plántulas de chile chilhuacle por efecto de irradiación gamma.

Dosis (Gy)	Macronutrientes (g kg <sup>-1</sup> )				
	N	P	K	Ca	Mg
0	20.84 abc	1.43 a	8.64 a	9.60 a	5.38 ab
10	16.41 c	1.28 a	8.42 a	9.05 a	5.58 b
20	18.40 bc	1.38 a	7.29 a	10.08 a	4.70 b
40	22.78 ab	1.49 a	7.84 a	9.80 a	4.70 b
80	20.14 abc	1.55 a	8.08 a	10.74 a	5.89 a
120	23.33 a	1.50 a	7.35 a	10.07 a	5.43 ab
160	23.13 ab	1.58 a	6.58 a	10.10 a	5.69 a

Gy = Grey; N = nitrógeno; P = fósforo; K = potasio; Ca = calcio; Mg = magnesio. Valores con letras distintas en columnas, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

De acuerdo con Murali y Teramura (1985), plantas de soja expuestas a radiación UV-B, disminuyó la altura de la planta, área foliar y biomasa total, pero, cuando es suministrado P el daño es minimizado. Por su parte Singh *et al.* (2013) en semillas de trigo con dosis de 25 Gy indujo mayor translocación de Fe de raíz a brotes en trigo. Cuando, las dosis fueron superiores a 100 Gy, hubo una reducción drástica

en la hoja bandera, fotosíntesis, rubisco, la nitrato reductasa y nutrientes como K, P, Mg, Fe, y Zn.

En el Cuadro 13 se observan los valores en la concentración de macronutrientes en tejido foliar por efecto del tipo de sustrato evaluado. Los valores en las medias del análisis estadístico muestran que no hubo diferencias significativas en la concentración de N foliar por efecto del tipo de sustrato. El análisis estadístico muestra que al utilizar peat moss se obtuvieron las medias más altas en la concentración de P ( $1.82 \text{ g kg}^{-1}$ ). Hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la concentración, ya que la concentración K y Ca en tejido foliar en el suelo fué mayor ( $8.98$  y  $12.35 \text{ g kg}^{-1}$ ), respecto al tezontle y peat moss. La mayor concentración de Mg fueron observados en tezontle y suelo ( $5.46$  y  $5.29 \text{ g kg}^{-1}$ ). Como se puede observar la menor concentración de P, K y Ca en tejido foliar se presentó al utilizar tezontle.

**Cuadro 13.** Concentración de macronutrientes en hojas de plántulas de chile chilhuacle por efecto del tipo de sustrato.

Sustrato	Macronutrientes ( $\text{g kg}^{-1}$ )				
	N	P	K	Ca	Mg
Peat moss	19.96 a	1.82 a	6.68 b	8.96 b	4.83 b
Tezontle	21.18 a	1.33 b	7.57 b	8.41 b	5.46 a
Suelo	21.02 a	1.22 b	8.98 a	12.35 a	5.29 a

Valores con letras distintas en columnas, son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

Estudios demuestran que las propiedades químicas del peat moss ( $5.36 \text{ mg kg}^{-1}$ ) posee mayor concentración de nutrientes como el P, que el tezontle ( $0.31 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Trejo-Téllez *et al.*, 2013); así pues la concentración de nutrientes en tejido foliar dependerá en gran medida del suministro de nutrientes del medio donde se desarrollan las raíces. Rangos óptimos para K en hojas jóvenes de pimientos oscilan entre  $40$  a  $54 \text{ mg kg}^{-1}$  con base en materia seca (Barker y Pilbeam, 2007), sin embargo, nuestros resultados superan los rangos anteriores para K. Si bien, la concentración de Ca en suelo fue mayor, los valores de Ca para peat moss y tezontle están dentro de los rangos óptimos. De acuerdo con Pilbeam y Morley (2007), para hojas jóvenes de *C. annuum* L. los valores oscilan en  $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Es necesario aclarar que sólo un

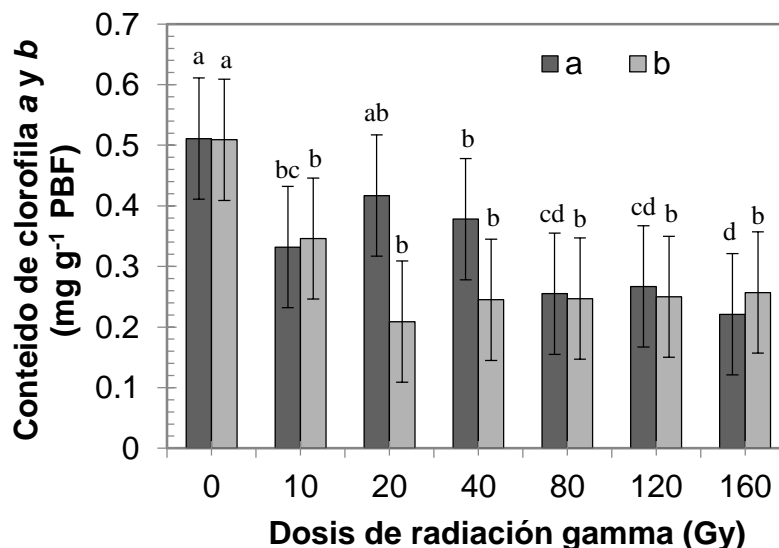
parte de la cantidad total de nutrientes en el suelo puede ser absorbido y utilizado por las plantas. La magnitud de esta fracción disponible depende del tipo de suelo, la especie de interés y de los factores ambientales ([Marschner y Rengel, 2012](#)). Además tener en cuenta que la actividad microbiana puede alterar sustancialmente la disponibilidad de nutrientes ([Neumann y Römhels, 2012](#)). Por tal motivo podemos deducir que la mayor concentración de K y Ca foliar, se debió a la disponibilidad presente en el suelo. Los valores de la interacción (dosis de radiación gamma x tipo de sustrato) se muestran en el Cuadro 14. No hubo diferencias significativas en la concentración de N por efecto de la interacción de los factores de estudio. Se observó que la interacción en los factores de estudio hubo diferencias significativas con la dosis de 80 y 120 Gy en la concentración P, K y Mg en el tejido foliar de plántulas.

**Cuadro 14.** Efecto de la interacción RG x sustrato en la concentración de macronutrientos ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en tejido foliar en plántulas de chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	Sustrato	N	P	K	Ca	Mg
0	Peat moss	21.35±1.52 abc	1.73±0.20 abcd	7.27±1.24 ab	7.76±0.89 a	4.62±0.31 bc
0	Suelo	22.28±1.22 abc	1.13±0.00 bcd	8.82±0.65 ab	7.94±0.17 a	5.45±0.08 abc
0	Tezontle	18.90±3.03 abc	1.42±0.31 abcd	9.83±1.27 ab	13.08±2.82 a	6.08±0.71 ab
10	Peat moss	21.58±1.01 abc	1.69±0.09 abcd	7.56±1.00 ab	9.12±0.57 a	4.74±0.25 abc
10	Suelo	7.58±0.20 d	1.25±0.21 abcd	9.09±0.96 ab	6.94±1.14 a	4.20±0.50 c
10	Tezontle	20.06±4.95 abc	0.91±0.15 d	8.62±1.38 ab	11.10±1.18 a	4.80±0.27 abc
20	Peat moss	12.01±7.50 cd	1.64±0.21 abcd	6.64±0.82 ab	8.70±1.26 a	4.73±0.27 abc
20	Suelo	19.95±4.37 abc	1.40±0.22 abcd	6.42±2.52 ab	8.94±1.52 a	4.86±0.38 abc
20	Tezontle	23.24±0.18 ab	1.09±0.25 cd	8.82±0.27 ab	12.37±2.67 a	4.50±0.68 bc
40	Peat moss	20.76±1.45 abc	1.82±0.21 abc	5.97±1.67 ab	8.96±1.12 a	4.52±0.42 bc
40	Suelo	24.03±0.20 ab	1.47±0.36 abcd	8.98±0.50 ab	8.64±2.20 a	5.18±0.91 abc
40	Tezontle	23.56±1.06 ab	1.17±0.27 bcd	8.56±0.46 ab	11.81±2.55 a	4.41±0.57 bc
80	Peat moss	23.21±1.61 ab	1.80±0.53 abcd	7.02±1.45 ab	9.33±3.10 a	4.96±0.86 abc
80	Suelo	23.45±0.70 ab	1.41±0.28 abcd	6.35±2.44 ab	9.42±2.30 a	6.55±0.73 a
80	Tezontle	13.76±7.18 bcd	1.45±0.39 abcd	10.86±1.98 a	13.48±3.61 a	6.17±1.06 ab
120	Peat moss	18.08±7.48 abc	2.09±0.57 a	6.63±1.78 ab	9.62±2.73 a	4.98±0.85 abc
120	Suelo	26.25±0.60 a	1.30±0.09 abcd	6.79±3.22 ab	8.87±0.45 a	5.99±0.09 abc
120	Tezontle	25.66±1.22 a	1.12±0.04 bcd	8.64±0.71 ab	11.73±0.26 a	5.31±0.15 abc
160	Peat moss	22.75±0.92 ab	2.01±0.19 ab	5.65±1.60 b	9.24±0.59 a	5.28±0.37 abc
160	Suelo	24.73±0.20 a	1.36±0.10 abcd	6.53±2.60 ab	8.14±0.47 a	6.00±0.26 abc
160	Tezontle	21.93±1.06 abc	1.38±0.42 abcd	7.57±1.79 ab	12.90±4.77 a	5.78±0.94 abc

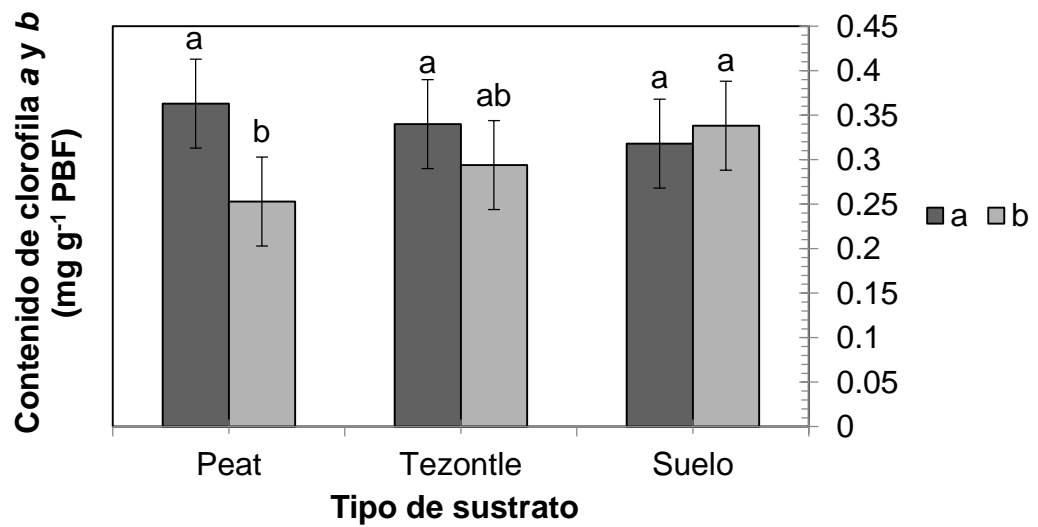
AP = Altura de plántula, NH = Número de hojas, DT = diámetro de tallo. Medias con letras distintas son estadísticamente diferente (Tukey, 0.05).

Se presentó una reducción significativa en el contenido clorofila *a* y *b* en los tratamientos con todas las dosis de irradiación, sin embargo, con la dosis de 20 y 160 Gy las reducciones de clorofila fueron más notables (Figura 1). Estudios demuestran que las clorofilas *a*, *b* y total son sensibles a la radiación, sin embargo, dependerá de la especie en estudio (Salama *et al.*, 2011). En mutantes de cebada observaron que el contenido de clorofila y carotenoides es deficiente cuando las plantas son jóvenes, pero los niveles de los pigmentos son normales durante su desarrollo (Maclachlan y Zalik, 1963). Una alta radiación ultravioleta-B puede causar inhibición de la fotosíntesis y la fotooxidación de pigmentos (Jordan, 2002). Cuando las semillas de pimiento fueron irradiadas, las plántulas presentaron alteración en la composición de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) (Kim *et al.*, 2004). De acuerdo con Calabrese y Baldwin, (2002), las respuestas de adaptación inducida por la radiación a bajas dosis son a menudo polémicas debido a la limitada magnitud de respuesta, por lo que es necesario el diseño y replicación del estudio para garantizar juicios fiables. Los análisis de clorofila también se realizaron en plantas adultas y los resultados se muestran en el capítulo VI.



**Figura 1.** Cambios en el contenido de clorofila *a* y *b* en plántulas de chile chilhuacle después de la irradiación gamma en semillas. Medias  $\pm$  SD de tres replicas en la extracción, letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

Los valores del contenido de clorofila *a* y *b* por efecto del tipo de sustrato se observan en la Figura 2. La clorofila *a* no mostró diferencias estadísticas significativas por efecto del tipo de sustrato empleado. Sin embargo, los valores de las medias más altas en el análisis estadístico, mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el contenido de clorofilas *b*, cuando las plántulas se desarrollaron en suelo. A diferencia del peat moss y tezontle, el suelo presentó mayor CIC en el análisis de suelo (Cuadro 4). Se sabe que el suministro de nutrientes pueden controlar indirectamente la fotosíntesis y senescencia foliar a través de la fotooxidación y señales hormonales (Engels *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Cambios en el contenido de clorofila *a* y *b* en plántulas de chile chilhuacle por efecto de tipo de sustrato empleado peat, tezontle y suelo. Todos los valores son Medias  $\pm$  SD de tres replicas en la extracción. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

Los valores del contenido de clorofilas *a* y *b* por efecto de la interacción (dosis de radiación x tipo de sustrato) se muestran en el Cuadro 15. El mayor contenido de clorofilas no fue influenciado por las dosis de RG, sin embargo, sí se observaron cambios importantes por el tipo de sustrato utilizado, el mayor contenido de clorofila *a* fue influenciado con el uso de la turba, en tanto el contenido de clorofilas *b* fue con el uso del tezontle.

**Cuadro 15.** Efecto de la interacción RG x sustrato en contenido de clorofilas a y b en plántulas de chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	Sustrato	Clorofila a (mg g <sup>-1</sup> )	Clorofila b (mg g <sup>-1</sup> )
0	Peat moss	0.64±0.07 a	0.47±0.15 ab
0	Suelo	0.52±0.05 ab	0.35±0.17 b
0	Tezontle	0.35±0.07 bcde	0.70±0.05 a
10	Peat moss	0.32±0.03 bcde	0.27±0.05 b
10	Suelo	0.32±0.06 bcde	0.31±0.07 b
10	Tezontle	0.34±0.06 bcde	0.45±0.10 ab
20	Peat moss	0.41±0.17 abcde	0.16±0.14 b
20	Suelo	0.39±0.03 bcde	0.25±0.01 b
20	Tezontle	0.44±0.07 abc	0.20±0.04 b
40	Peat moss	0.29±0.06 cde	0.19±0.07 b
40	Suelo	0.42±0.06 abcd	0.35±0.02 b
40	Tezontle	0.42±0.03 abcd	0.19±0.17 b
80	Peat moss	0.30±0.03 bcde	0.15±0.10 b
80	Suelo	0.20±0.07 de	0.25±0.12 b
80	Tezontle	0.25±0.06 cde	0.33±0.05 b
120	Peat moss	0.27±0.13 cde	0.20±0.04 b
120	Suelo	0.30±0.08 bcde	0.25±0.16 b
120	Tezontle	0.21±0.05 cde	0.29±0.03 b
160	Peat moss	0.28±0.01 cde	0.31±0.10 b
160	Suelo	0.19±0.09 de	0.27±0.11 b
160	Tezontle	0.18±0.04 e	0.19±0.04 b

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

### 3.4. CONCLUSIONES

El uso de la radiación gamma en las semillas de chile chilhuacle, indujo cambios positivos e importantes en el crecimiento de las plántulas de chile chilhuacle, como en, altura de planta, diámetro de tallo, las lecturas SPAD (80, 40 y 120 Gy). Con 80 Gy es posible incrementar el volumen de raíz y su biomasa. La concentración de N más alta en el tejido foliar fue inducida por una la dosis de 120 Gy. El peat moss sólo incrementó en N y P en suelo fueron los sustratos con mayor influencia en la mayoría de los parámetros evaluado. El desarrollo de esta investigación nos brindó una perspectiva ventajosa para los futuros programas de mejoramiento del chile chilhuacle.

### 3.5. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rincón, V. H., T. T. Corona, L. P. López. M. L. Latournerie, M. M. Ramírez, M. H. Villalón and C. J. A. Aguilar.** 2010. Los Chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, AUN. p. 11-114. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Ahloowalia, B. S., and M. Maluszynski.** 2001. Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118: 167-173.
- Albokari, M.** 2014. Induction of mutants in durum wheat (*Triticum durum* desf cv. samra) using gamma irradiation. *Pakistan Journal of Botany*, 46: 317-324.
- Alcántar G., G. y M. Sandoval V.** 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de Muestreo, Preparación, Análisis e Interpretación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. 156 p.
- Alzugaray, P., D. Haase, and R. Rose.** 2004. Efecto del volumen radicular y la tasa de fertilización sobre el comportamiento en terreno de plantas de pino oregón (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) producidas con el método 1+1. *Bosque* (Valdivia), 25: 17-33.
- Ameri, A., A. Tehranifar and G. H. Davarynejad.** 2012. Effect of substrate and cultivar on growth characteristic of strawberry in soilless culture system. *African Journal of Biotechnology*, 11: 11960-11966.
- Arredondo, J. L. O., J. Z. C. Ramos, J. J. M. Ramos, G. A. González, L. T. Chávez, P. V. Tapia y S. E Reyes.** 2008. Eficiencia de suelo y tezontle en sistemas de producción de tomate en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31: 367-374.
- Barakat, M. N., R. S. A Fattah, M. Badr, and M. G. El-Torky.** 2010. *In vitro* mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium*. *African Journal of Agricultural Research*, 5: 748-757.
- Barker, A. V., and D. J. Pilbeam.** 2015. Handbook of plant nutrition. CRC press. Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Beaton, J. D., and W. Nelson. L.** 2005. Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management (Vol. 515). Upper Saddle River, New Jersey, USA: Pearson Prentice Hall, pp. 15-18.



- Borzouei, A., M. Kafi, H. Khazaei, B. Naseriyan and A. Majdabadi.** 2010. Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Pakistan Journal Botany*, 42: 2281-2290.
- Bremner, J. M.** 1965. Total nitrogen. In C. A. Black (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2 Chemical and microbiological properties.* Madison, WI, USA: American Society of Agronomy Inc. Publisher, pp. 1149–1178.
- Burés, S.** 1997. *Sustratos.* Madrid: Ediciones Agrotécnicas. pp. 54-254
- Cabrera, R. I.** 1999. Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 5: 5-11.
- Calabrese, E. J., and L. A. Baldwin.** 2002. Defining hormesis. *Human and experimental toxicology*, 21: 91-97.
- Charbaji, T., and I. Nabulsi.** 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on in vitro growth of grapevine. *Plant cell, tissue and organ culture*, 57: 129-132.
- Clement, C. R., DE M. Cristo-Araújo, G. Coppens D'Eeckenbrugge, A. Alves Pereira and D. Picanço-Rodrigues.** 2010. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*, 2: 72-106.
- Engels, C., E. Kirkby and P. J. White.** 2012. Mineral nutrition, yield and source-sink relationships. *Mineral nutrition of higher plants.* 3<sup>rd</sup> end. Elsevier Ltd, pp. 85-131.
- Fahad, A and K. Salim.** 2009. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. *World Applied Sciences Journal*, 6: 1589-1601.
- Falusi, O. A., O. Y. Daudu, and J. A. Teixeira da Silva.** 2012. Effect of exposure time of fast neutron irradiation on growth and yield parameters of *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*. *African Journal of Plant Science*, 6: 251-255.
- García, O., G. Alcántar, R. I. Cabrera, F. Gavi, y V. Volke.** 2001. Evaluación de sustratos para la producción de *Epipremnum aureum* y *Spathiphyllum wallisii* cultivadas en maceta. *Terra latinoamericana*, 19: 249-258.
- García-Gaytán, V., F. C. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, G. A. Baca-Castillo and S. García-Morales.** 2017. The Chilhuacle Chili (*Capsicum annum* L.) in Mexico: Description of the Variety, Its Cultivation, and Uses. *International Journal of Agronomy*, ID 5641680, p. 13.

- Geiger, M., P. Walch-Liu, C. Engels, J. Harnecker, E-D. Schulze, Ludewig F, et al.** 1999. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell and Environment*, 21: 253–268.
- Ghani, M., S. Kumar and M. Thakur.** 2013. Induction of novel variants through physical and chemical mutagenesis in Barbeton daisy (*Gerbera jamesonii* Hook). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88: 585-590.
- Grossnickle, S. C.** 2005. Importance of root growth in overcoming planting stress. *New Forests*, 30: 273-294.
- Grover, S., and A. S. Khan.** 2014. Effect of ionizing radiation on some characteristics of seeds of wheat. *International Journal of Science and Technology Research*, 3: 2277-8616.
- Haase, D. L., and R. Rose.** 1994. Effects of soil water content and initial root volume on the nutrient status of 2+0 Douglas-fir seedlings. *New Forests*, 8: 265-277.
- Hamideldin, N., and O. S. Hussien.** 2013. Morphological, physiological and molecular changes in *Solanum tuberosum* L. in response to pre-sowing tuber irradiation by gamma rays. *American Journal of Food Science and Technology*, 1: 36-41.
- Jan, S., T. Parween and T. O. Siddiqi.** 2012. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews*, 20: 17-39.
- Jordan, B. R.** 2002. Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Functional Plant Biology*, 29: 909–916.
- Keykha, F., A. Bagheri, N. Moshtaghi and A. Nezami.** 2011. The effect of gamma radiation on freezing tolerance of chickpea-*Cicer arietinum* L. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5.
- Kim, J. H. B. Y. Chung, J. S. Kim, and S. G. Wi.** 2005. Effect of in planta Gamma-Irradiation on Growth, Photosynthesis, and Antioxidative Capacity of Red Pepper (*Capsicum annum* L.) Plants. *Journal of Plant Biology*, 48: 47-56.

- Kim, J. H., M. H. Baek, B. Y. Chung, S. G. Wi, and J. S. Kim.** 2004. Alteration in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *Journal of Plant Biology*, 47: 314-321.
- Maclachlan, S., and S. Zalik.** 1963. Plastid structure, chlorophyll concentration, and free amino acid composition of a chlorophyll mutant of barley. *Canadian Journal of Botany*, 41: 1053-1062.
- Maity, J. P., S. Kar, A. Chakraborty, M. Sudershan, and S. C. Santra.** 2010. Study on trace elements (using energy dispersive X-ray fluorescence technique) of edible seeds from *Cicer arietinum* L. plants developed from gamma irradiated seeds and variation of yielding capacity. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 283: 225-230.
- Marcu, D., V. Cristea, and L. Daraban.** 2013. Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) seedlings. *International Journal of Radiation Biology*, 89: 219-223.
- Marschner, H., and Z. Rengel.** 2012. Nutrient availability in soils. Mineral nutrition of higher plants, (Chapter 12) (Third Edition), pp. 315-330.
- Martínez, P. F., and D. Roca.** 2011. Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo, in: *Sustrato, Manejo del Clima, Automatización y Control en Sistemas de cultivo sin suelo*. R. V. J. Flórez (ed), Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, pp. 37-77.
- Melki, M., and A. Marouani.** 2010. Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 307-310.
- Mohajer, S., R. Mat Taha, M. M. Lay, A. Khorasani Esmaeili, and M. Khalili.** 2014. Stimulatory Effects of Gamma Irradiation on Phytochemical Properties, Mitotic Behaviour, and Nutritional Composition of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *The Scientific World Journal*, 2014.
- Naegele, R. P., J. Mitchell and M. K. Hausbeck.** 2016. Genetic Diversity, Population Structure, and Heritability of Fruit Traits in *Capsicum annuum*. *PloS one*, 11: e0156969.

- Neumann, G., and V. Römheld.** 2012. Rhizosphere chemistry in relation to plant nutrition. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. (Chapter 14) (Third Edition), pp. 347-368.
- Ortega-Martínez, L. D., J. Sánchez-Olarte, J. Ocampo-Mendoza, E. Sandoval-Castro, B. A. Salcido-Ramos, and F. Manzo-Ramos.** 2010. Efecto de diferentes sustratos en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de invernadero. Ra Ximhai, 6: 339-346.
- Perry, L. and K. V. Flannery.** 2007. Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 104: 11905-11909.
- Pilbeam, D. J. and P. S. Morley.** 2007. Handbook of plant nutrition. In: Barker AV, Pilbeam DJ. (eds.) CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Piri, I., M. Babayan, A. Tavassoli and M. Javaheri.** 2011. The use of gamma irradiation in agriculture. African Journal of Microbiology Research, 5: 5806-5811.
- Prasch, C. M., and U. Sonnewald.** 2015. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. Environmental and Experimental Botany, 114: 4-14.
- Rollins, J. A., E. Habte, S. E. Templer, T. Colby, J. Schmidt and M. v. Korff.** 2013. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Experimental Botany, 64: 3201-3212.
- Salama, H. M., A. A. Al Watban, and A. T. Al-Fughom.** 2011. Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. Saudi Journal of Biological Sciences, 18: 79-86.
- SAS Institute Inc.** 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Scaldaferro, M. A., A. R. Prina, E. A. Moscone, and J. Kwasniewska.** 2013. Effects of ionizing radiation on *Capsicum baccatum* var. pendulum (*Solanaceae*). Applied Radiation and Isotopes, 79: 103-108.

- Shirley, B. W., S. Hanley and H. M. Goodman.** 1992. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *The Plant Cell*, 4: 333-347.
- Singh, B., S. Ahuja, R. K. Singhal, and P. V. Babu.** 2013. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 298: 249-257.
- Suzuki, N., R. M. Rivero, V. Shulaev, E. Blumwals and R. Mittler.** 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203: 32-43.
- Trejo-Télez, L. I., M. Ramírez-Martínez, F. C. Gómez-Merino, J. C. García-Albarado, G. A. Baca-Castillo y O. Tejeda-Sartorius.** 2013. Evaluación física y química de tezontle y su uso en la producción de tulipán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5: 863-876.
- Velasco-Hernández, E., I. Miranda-Velázquez, R. Nieto-Ángel, H. Villegas-Rodríguez.** 2004. Evaluación de sustratos y variedades en la producción protegida de jitomates. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10: 239-246.
- Vile, D., M. Pervent, M. Belluau, F. Vasseur, J. Bresson, B. Muller, C. Grenier and T. Simonneau.** 2012. *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects?. *Plant, Cell and Environment*, 35: 702-718.
- Wang, D and P. W. Bosland.** 2006. The Genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41: 1169-1187.
- Warncke, D. D. 1986.** Analyzing greenhouse growth media by the saturation extraction method. *HortScience*, 21: 223–225.

## **CAPÍTULO IV.**

## CAPÍTULO IV.

### FIRST REPORT OF POWDERY MILDEW IN CHILHUACLE CHILI (*Capsicum annuum*) CAUSED BY *Leveillula taurica* IN SOUTHERN MEXICO

#### 4.1. DISEASE NOTES

In the summer of 2014, Chilhuacle chili (*Capsicum annuum* L.) plants grown in a greenhouse developed white mycelium on the abaxial side of their leaves, as well as severe foliar damage that resulted in leaf fall. In order to identify the causative agent of this disease, mycelium was collected using strips of adhesive transparent tape, and then placed onto a glass slide for examination under a stereoscopic microscope attached to a digital camera. We could distinguish the presence of asexual dimorphic conidia, conidiophores with primary terminal conidium, secondary conidia in short chains, primary lanceolate conidia, and the germination of cylindrical conidia. Using Images Plus 2.0 software, conidia were measured, revealing the following average values:  $68.95 \pm 12.58 \times 15.52 \pm 2.04 \mu\text{m}$  ( $n= 10$ ) long and wide for primary conidia;  $57.1 \pm 10.03 \times 15.19 \pm 3.91 \mu\text{m}$  ( $n= 10$ ) long and wide for secondary conidia; and  $167.26 \pm 38.19 \mu\text{m}$  ( $n= 9$ ) long for conidiophores. Based on the morphology and size of the conidia, we could identify the fungus *Leveillula taurica* (Glawe *et al.*, 2005) as the causative agent of the powdery mildew. To confirm the identity of this fungus using the PCR technique, we amplified and sequenced the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA, using the universal primers ITS5/ITS4 (750 bp) and ITS1/ITS4 (700 bp). The resulting sequences were deposited in GenBank under accession nos. KU886148 and KU886145. BLASTn analysis showed 100% nt identity with those of *L. taurica* found on *Cynanchum kashgaricum* in China (JN861731) and *Mentzelia laevicaulis* in the United States (GQ860947). Therefore, both morphological and molecular criteria confirmed the presence of *L. taurica* on Chilhuacle chili leaves. To test of pathogenicity, 40-day-old plants were inoculated with  $2.5 \times 10^4$  conidia ml<sup>-1</sup>. The prepared inoculum was sprayed onto the abaxial side of the leaves; subsequently, plants were covered with a plastic bag in order to maintain high humidity during the following 24 h after inoculation. Plants inoculated with sterile distilled water served as

control. Symptoms were detected 15 days after inoculation, with white powdery mildew evident on the leaves. Afterward, new conidia were collected and observed under the microscope, and further molecular analysis were performed as described, confirming the presence of *L. taurica* on Chilhuacle chili leaves. The first report of this fungus in Mexico was published in 1999, in which the morphology of a sample isolated from pepper grown in north-central Mexico was described (Velásquez-Valle and Valle-Garcia, 1999). Herein we are reporting the presence of this pathogen in Chilhuacle chili from southern Mexico. According to Kraft et al. (2014), genetic similarity among cultivated chilies from northern and southern Mexico is low. Chilhuacle chili is endemic to the Cañada Region in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve of the State of Oaxaca, Mexico. This local cultivar of *C. annuum* produces the main ingredient used in making Oaxaca Black Mole, one of the typical Mexican dishes recognized by international gastronomy. To our knowledge, this is the first report of *L. taurica* in Chilhuacle chili in southern Mexico and in the world.

#### 4.2. LITERATURE CITED

- Glawe, D. A., F. M. Dugan, Y. Liu and J. D. Rogers.** 2005. First record and characterization of a powdery mildew on a member of the Juncaginaceae: *Leveillula taurica* on *Triglochin maritima*. *Mycological Progress*, 4: 291-298.
- Kraft, K. H., C. H. Brown, G. P. Nabhan, E. Luedeling, J. D. J. L. Ruiz, G. C. d'Eeckenbrugge and P. Gepts.** 2014. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 6165-6170.
- Velásquez-Valle, R., and Valle-Garcia, P.** 1999. First report of powdery mildew of pepper in North-Central Mexico. *Plant Disease*, 83: 302-30



## **CAPÍTULO V.**

## CAPÍTULO V.

### **GAMMA RADIATION AND OSMOTIC POTENTIAL OF THE NUTRIENT SOLUTION DIFFERENTIALLY AFFECT MACRONUTRIENT CONCENTRATIONS, pH AND EC IN CHILHUACLE PEPPER FRUIT**

#### **Resumen**

Las semillas de chile chilhuacle (*Capsicum annuum* L.) fueron expuestas a dosis de radiación gamma (GR) (0, 10, 80 y 120 Gy) y las plantas fueron cultivadas en hidroponía con diferentes potenciales osmóticos (PO) (– 0.036, – 0.072, – 0.092 y – 0.108 MPa) de la solución de nutrientes. Medimos la concentración de nutrientes, el pH y la conductividad eléctrica (EC) en frutas en diferentes momentos después del trasplante (70, 90 y 130 dat) y encontramos el GR, la solución de nutrientes PO y sus interacciones afectadas diferencialmente N, P, K, Ca y las concentraciones de Mg, así como el pH y CE en pimientos de chilhuacle.

**Palabras clave:** radiación gamma, pimiento mexicano, calidad de fruta, potencial osmótico, hidroponía

#### **Abstract**

Chilhuacle pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds were exposed to gamma radiation (GR) doses (0, 10, 80 and 120 Gy), and plants were grown in hydroponics with different osmotic potentials (OP) (– 0.036, – 0.072, – 0.092 and – 0.108 MPa) of the nutrient solution. We measured the nutrient concentration, pH and electrical conductivity (EC) in fruits at different time points after transplanting (70, 90 and 130 dat), and found the GR, nutrient solution OP and their interactions differentially affected N, P, K, Ca and Mg concentrations, as well as pH and EC in chilhuacle peppers.

**Keywords:** Gamma radiation, mexican peppers, fruit quality, osmotic potential, hydroponics

## 5.1. INTRODUCTION

Chilhuacle pepper (*Capsicum annum* L.) is native to the Cañada region of Oaxaca State, Mexico. It is internationally recognized as a culinary species in the making of Oaxaca black mole and is also used as a dehydrated pepper. In Oaxaca, very few technological packages have been developed for this crop, evidencing the need for increased research to improve its production system. Furthermore, climate change is affecting its production and productivity. One way to improve crop productivity and develop adaptations to environmental challenges is by generating genetic variability through mutations induced by gamma radiation (Oladosu *et al.*, 2016).

Induced mutations have had positive impact on developing greater exploratory capacity of the roots, higher absorption of specific ions, as well as improved resistance to diseases and tolerance to drought and salinity (Ahloowalia *et al.*, 2004). To induce mutations, biological material is exposed to physical and chemical mutagenic agents. The gamma radiation of radioactive  $^{60}\text{Co}$  is the most-used physical mutagen. In the seeds of the forage species *Onobrychis viciifolia*, radiation with  $^{60}\text{Co}$  at 30 Gy increased the N and P contents (Mohajer *et al.*, 2014). In wheat (*Triticum aestivum*), gamma radiation resulted in important changes in the concentration of macro- and micronutrients in leaves and stems at different growth stages (Singh and Datta, 2010). Also in wheat, the application of 25 Gy increased the Fe concentration in shoots (Singh *et al.*, 2013). In peas (*Pisum sativum*), irradiating leaves with UV light (300-400 nm) increased nodulation and symbiotic N fixation (Shiozaki *et al.*, 1999). In edible chickpea (*Cicer arietinum*) seed, the accumulation of macro- and micronutrients increased with 0.15 and 0.20 kGy. However, irradiation with 2 kGy in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) grains had no effect on nutritional quality as expressed by mineral content and bio-availability (Hassan *et al.*, 2009). In *Vigna radiata*, exposure to  $7.2 \text{ kJ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$  UV-B radiation decreases the activity of the enzymes nitrogenase (Nase), nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR), as well as the content of leghemoglobin, which is essential in the fixation process of atmospheric N (Choudhary and Agrawal, 2014). These findings prove that each genotype can exhibit different adaptive responses to ionizing radiation in terms of

nutritional balance (Maity *et al.*, 2010), while fully understanding the intraspecific responses caused by radiation remains a daunting task. In addition,  $^{60}\text{Co}$  irradiation can also induce greater tolerance to stress factors in plants. In alfalfa (*Medicago sativa*), the application of 350 Gy gamma radiation generated populations that were more tolerant to salinity by increasing the  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ratio observed in the aerial parts (Rejili *et al.*, 2008). Gamma radiation, at low doses, induces tolerance to saline stress, likely through stimulation of signal transduction pathways and the modulation of physiological responses (Qi *et al.*, 2014).

Hydroponic systems have been utilized as one of the standard methods for plant biology research and are also used in commercial production for several crops (Nguyen *et al.*, 2016). Since hydroponics allows for efficient water and fertilizer use, as well as better control over environmental conditions, the community is keen to utilize this system to perform experiments. In hydroponics, the total amount of ions of dissolved salts in the nutrient solution determines its osmotic potential (OP), which is a colligative property of the solution and is clearly dependent on the amount of dissolved solutes (Trejo-Téllez *et al.*, 2012). In a number of varieties of *Capsicum annum*, different osmotic potential have been tested, though no such information for chilhuacle chili could be found in our literature review. It has been well documented that by lowering osmotic potential values in the nutrient solution, the pH of fruits also decreases (Albu-Yaron *et al.*, 1993). On the other hand, by increasing the gamma radiation dose, EC values in plant tissues may also increase (Amjad y Anjum, 2003).

The objective of the present research was to evaluate the effect of gamma radiation with  $^{60}\text{Co}$  on chilhuacle pepper seeds and that of the osmotic potential of the nutrient solution in the macronutrient concentration, pH and electrical conductivity (EC) of fruit pulp of this variety of pepper.

## **5.2. MATERIALS AND METHODS**

### **5.2.1. Experimental conditions**

The experiment was conducted at the Colegio de Postgraduados Campus Montecillo Experimental Station (19°20'N.L., 98°53'W.L., 2250 m.a.s.l.). Plants were

grown hydroponically in a top-ventilated metal greenhouse covered with plastic (luminosity transmittance for 50%) with a 16 h photoperiod at 23/13 °C (day/night), 35.5/64.5% relative humidity (day/night), under natural light conditions. The mean luminosity was 250.32  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ .

### **5.2.2. Plant material**

Chilhuacle pepper fruits were collected from the Cañada region in Oaxaca State, Mexico (18°08'N.L., 97°05'W.L., 620 m.a.s.l.). Subsequently, the seeds were transported to Texcoco, Mexico (19°20'N.L., 98°53'W.L., 2250 m.a.s.l.), for processing. Once the seeds were removed from the fruit placenta, they were disinfected with 2% (v/v) sodium hypochlorite for 20 min and rinsed with sterile distilled water three times to remove hypochlorite residue. The seeds were placed on paper towels to remove moisture, and remained temperature until they reached 25% moisture.

### **5.2.3. Seed irradiation**

The seeds were irradiated with a Transelektro GLI-01 irradiator (IZOTOP; Budapest, Hungary) at the National Institute of Nuclear Research (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares – ININ), located in La Marquesa, Ocoyoacac, Mexico. The  $^{60}\text{Co}$  isotope was used at doses of 10, 80 and 120 Gy (dose rate of 1.28 kGy/h<sup>-1</sup>) in 100-seed lots per treatment, plus an un-irradiated (0 Gy) control lot. Mutagenic effects and the optimum dose of gamma rays used in pepper (*Capsicum annuum*) have been reported between 80 and 120 Gy ([Tomlekova, 2010](#)).

### **5.2.4. Seed germination and transplantation of plantlets**

Irradiated and control chilhuacle pepper seeds were sown in polystyrene trays with 200 cavities, using peatmoss as substrate. The germination was performed in the greenhouse, under the aforementioned environmental conditions. Transplantation was done when the plants had five true leaves; 40 days after germination, they were placed in a hydroponic system. The containers were black, 600-gauge polyethylene bags, with holes in the base to allow the nutrient solution to drain. Porous inert volcanic

gravel, locally known as tezontle, with a particle size of 2-5 mm, was used as substrate. This volcanic gravel is fairly inexpensive, highly available in Mexico, comes in many different sizes and is thus regularly used in hydroponics.

### **5.2.5. Treatments and experimental design**

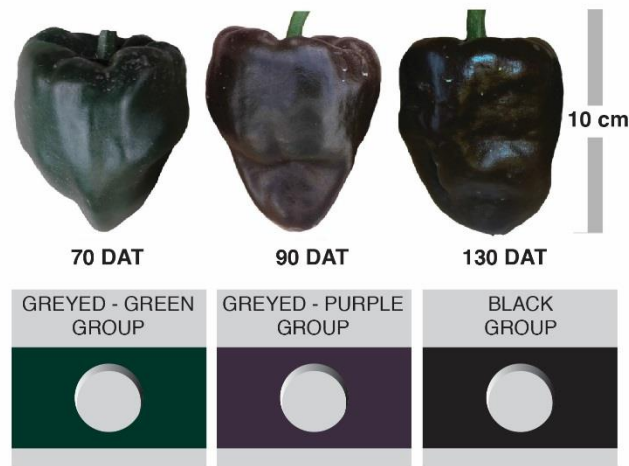
Using the chilhuacle plantlets derived from seeds either irradiated (10, 80 and 120 Gy) or un-irradiated (0 Gy), four osmotic potentials (OP) in the nutrient solution were evaluated:  $-0.036$ ,  $-0.072$ ,  $-0.092$  and  $-0.108$  MPa. The nutrient solutions were formulated based on the Steiner Universal Nutrient Solution, where 100% concentration in  $\text{mol}_c \text{m}^{-3}$  is as follows:  $12.0 \text{NO}_3^-$ ,  $1.0 \text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $7.0 \text{SO}_4^{2-}$ ,  $7.0 \text{K}^+$ ,  $9.0 \text{Ca}^{2+}$ , and  $4.0 \text{Mg}^{2+}$ , with an osmotic potential of  $-0.072$  MPa. The nutrient solution was supplemented with micronutrients (Tradecorp AZ™; Guadalajara, Jalisco, México) at the following concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ): 5.0 Fe; 2.33 Mn; 0.47 Zn; 0.19 Cu; 0.43 B and 0.17 Mo. The OP was monitored with a cryoscopic osmometer (Osmomat-30, Gonotec GmbH; Berlin, Germany), which has a measuring range of 0 to approximately  $3000 \text{mOsmol kg}^{-1}$ , and a resolution of  $1 \text{mOsmol kg}^{-1}$  over the entire measuring range. The pH of the nutrient solution was 5.5 and it was monitored every day with a Conductronic PC18 potentiometer (Puebla, Mexico). This potentiometer has the following precision  $\pm 0.02$  for pH and 1.5% for EC. Adjustment of pH was done when needed using concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  or  $\text{NaOH}$  1N. Combination of different gamma radiation (GR) levels (0, 10, 80, and 120 Gy) and osmotic potential (OP) levels ( $-0.036$ ,  $-0.072$ ,  $-0.092$ , and  $-0.108$  MPa) gave 16 distinct treatments. The treatments were arranged in a  $4^2$  factorial design with 8 replicates. The experimental design was completely randomized, and the experimental unit consisted of one black 10-L polyethylene bag, containing one pepper plant each.

### **5.2.6. Evaluated variables**

#### **5.2.6.1. Macronutrient concentration in fruits**

The nutrient concentration in the chilhuacle pepper fruits was determined in three maturation stages at 70, 90, and 130 days after transplantation (dat); fruit color changes during the different developmental stages were determined according to the

Royal Horticultural Society color chart (Chart RC, 2015) (Figure 1). The dry and ground fruit material was wet-digested ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4$ , 2:1, v:v). The resulting digest was used to quantify total N concentration using the Semi micro-Kjeldhal method (Bremner, 1965), while P, K, Ca and Mg concentrations were determined in the same extracts using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES; Agilent 725-OES, Australia).



**Figure 1.** Variation in color of chilhuacle fruits according to maturation stages determined based on the Royal Horticultural Society color chart (Chart RC, 2015).

#### **5.2.6.2. Fruit pulp pH and EC**

To determine pH and EC, fresh chilhuacle pepper fruits were harvested from each treatment at 130 dat. Composite samples with four fruits were prepared, and six replicates of each treatment were evaluated. From each composite sample, 10 g of pulp were taken and combined with 50 mL of distilled water. Each hydrated sample was ground in a blender (Osterizer; Tlaltepantla, Mexico). The pH and EC values were determined with a potentiometer (Conductronic, PC18; Puebla, Mexico).

### 5.2.7. Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical software SAS ver. 9.3. We carried out an analysis of variance (Proc ANOVA). Means comparison was done using Tukey's test with a significance value of 95% ( $P \leq 0.05$ ), in order to determine significant differences among treatments.

## 5.3. RESULTS AND DISCUSSION

### 5.3.1. Macronutrient concentration in fruits

Gamma radiation has been shown to affect mineral content of several plants (Nassar *et al.*, 2004). For example, N, P and K contents in castor bean (*Ricinus communis*) were increased especially when seeds were exposed to 50 Gy of gamma rays (Abbas *et al.*, 2015) High doses of gamma irradiation (i.e. 20–160 Gy) severely damaged Yorkshire fog grass (*Holcus lanatus*) plants, leading to a reduced rate of N metabolism and mobilization relative to healthy tissues, thereby causing apparently greater and more constant N content (Jones *et al.*, 2004). The increased in total soluble N may be attributed to the quantitative changes in non-protein N or the accumulation of catabolic tissues products (Bajaj, 1970). Similarly, increased contents of different plant nutrients due to gamma radiation treatments have been reported in rice plantlets exposed to 40–120 Gy (Ling *et al.*, 2013), chamomile (*Chamomilla recutita*) treated with 20–160 Gy (Nassar *et al.*, 2004), and rocket (*Eruca vesicatoria* subsp. *sativa*) plants exposed to 20 Gy (Moussa, 2006), to mention just some examples. Conversely, decrease in nutrient contents due to exposure to gamma radiation have been reported in pepper (Iqbal, 1976), and prickly burr (*Datura innoxia*) (Tikhonov *et al.*, 1980), while irradiation tomato seeds with 2.5 k-rad gamma rays did not affect the concentration of N or P (Zham and Voloozh, 1976). Moreover, maize, cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), onion (*Allium cepa*) and carrot (*Daucus carota*) seeds exposed to 2–10 k-rad resulted in a random, infrequent and irregular pattern of both increases and decreases in plant uptake of N, and P, and in general did not changes any yield parameter (Rennie and Nelson, 1975). Nevertheless, our literature survey showed that there is not research evidence available regarding the biochemical and molecular mechanisms responsible for the effect of gamma irradiation on nutrient contents in



plant systems. Moreover, we were unable to find any study in the literature identifying potential effects of gamma radiation on pH and EC of fruits and pulp, derived from mutant plants produced by gamma irradiation.

In our study, gamma radiation (GR) and osmotic potential (OP) did not affect the N concentration in chilhuacle pepper fruits at 70 dat. By contrast, GR increased the N concentration in the fruit at 90 dat. With 10 Gy, the N concentration increased by 59.6% compared to the control. This positive trend was also observed at 130 dat, with percentage increases in N concentration of 8.5, 14.2, and 25.5% for 10, 80, and 120 Gy, respectively, compared to the control (Table 1). Irradiating rocket seeds with 20 Gy increased the N and K contents in the plant, as well as total sugar, proteins, free amino acids, soluble phenol, kinetin, GA<sub>3</sub>, and NR activity (Moussa, 2006). Similarly, when the soil is treated with gamma radiation (0 to 205 Gy), N and P availability increases immediately after treatment and 2 weeks after incubation (Eno and Popenoe, 1963). This phenomenon may be due to the destruction of living soil microflora and the consequent release of N and P after irradiation (Burgos, 1964). Indeed, larger soil organic molecules can be broken down into smaller fragments after exposure to ionizing radiation across different soil types, because this sort of radiation can create free hydrogen and hydroxyl radicals that are reactive as reducing and oxidizing agents to cleave C–C and N–N bonds (Cawse, 1967; Razavi and Lakzian, 2007; Bank *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Importantly, the release of plant nutrients from the soil solution also depends in the type of soil and the amount of organic matter it contains (Eno and Popenoe, 1963). In plants, gamma radiation may increase protein and N content as a result of an enhanced activity of the enzymes involved in the metabolism of this nutrient, such as NR (Moussa, 2006).

**Table 1.** Concentration of N, P, K, Ca and Mg (g kg<sup>-1</sup> dry matter) in chilhuacle pepper fruits at 70, 90, and 130 dat in response to main effects of the study factors: GR (Gy) and OP (MPa).

70 dat					
Dose (Gy)	N	P	K	Ca	Mg
0	54.600 a	3.676 d	10.040 d	0.798 b	2.195 d
10	54.833 a	4.222 b	10.870 a	0.833 ab	2.232 b
80	53.550 a	4.426 a	10.840 b	0.878 a	2.223 c
120	51.450 a	4.135 c	10.590 c	0.671 c	2.331 a
OP (MPa)	N	P	K	Ca	Mg
-0.036	53.958 a	3.754 d	10.320 d	0.941 a	2.129 d
-0.072	59.908 a	4.013 c	10.530 c	0.732 b	2.174 c
-0.092	46.783 a	4.320 b	10.770 a	0.785 b	2.327 b
-0.108	53.783 a	4.372 a	10.730 b	0.721 b	2.350 a
90 dat					
Dose (Gy)	N	P	K	Ca	Mg
0	37.330 d	3.282 d	11.460 b	0.999 a	1.722 d
10	59.560 a	4.041 a	11.87 a	0.982 a	1.746 c
80	47.130 b	3.800 c	11.34 c	0.957 a	2.053 a
120	41.070 c	3.904 b	11.05 d	0.979 a	1.927 b
OP (MPa)	N	P	K	Ca	Mg
-0.036	34.010 c	3.566 d	11.120 d	1.023 a	1.672 d
-0.072	53.320 a	3.731 c	11.260 c	0.966 a	1.931 b
-0.092	53.320 a	3.745 b	11.380 b	0.962 a	1.878 c
-0.108	44.45 b	3.984 a	11.970 a	0.967 a	1.968 a
130 dat					
Dose (Gy)	N	P	K	Ca	Mg
0	16.21 d	4.168 d	8.47 d	1.296 c	1.872 b
10	17.59 b	4.516 b	9.56 b	1.134 d	1.855 c
80	17.06 c	4.416 c	9.36 c	1.366 a	1.786 d
120	17.82 a	4.696 a	10.23 a	1.319 b	1.985 a
OP (MPa)	N	P	K	Ca	Mg
-0.036	14.98 d	4.297 d	8.558 d	1.432 a	1.828 c
-0.072	17.43 b	4.580 a	9.240 c	1.342 b	1.974 a
-0.092	17.04 c	4.402 c	9.859 b	1.209 c	1.963 b
-0.108	19.23 a	4.517 b	9.969 a	1.130 d	1.733 d

Means followed by different letter in each column indicate significant differences among treatments (levels of GR and OP), study factor (GR or OP) or days of sampling (70, 90 or 130 dat) (Tukey, 0.05)

The OP had significant effects on all of the sampling dates and, in general, decreased the N concentration when the fruit reached maturity. At 90 and 130 dat, the lowest N concentrations in fruits were observed with the lowest OP in the nutrient solution Table 1. These results coincide with those obtained in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings where, as the OP in the nutrient solution decreased, the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration decreased (Luque and Bingham, 1981).

Under our experimental conditions, the P concentration in fruits was 20.4% higher in plants derived from seeds exposed to 80 Gy than the control at 70 dat. It was also 23.1% and 12.7% higher than the control in fruits of plants grown from seeds irradiated with 10 and 120 Gy at 90 and 130 dat (Table 1). However, in wheat, radiation with 5, 25 and 100 Gy negatively affected P concentrations in both roots and shoots (Singh *et al.*, 2013). On the other hand, the P concentration in wheat leaves and stems was higher in plants treated with 0.1 kGy than in the control during the first growth stage (Singh and Datta, 2010). In velvet bean (*Mucuna pruriens*), the P concentration increased proportionally with the dose of radiation applied (from 2.5 to 15 kGy) (Bhat *et al.*, 2008).

With regard to the effect of the OP, in the first two sampling dates, the P concentration was higher in plants grown with solutions at -0.108 MPa; at 130 dat, this variable was higher, with an OP of - 0.072 MPa. In every case, the highest OP (- 0.036 MPa) caused the lowest P concentrations (Table 1). This was due to the low P concentration and consequently its low availability in the medium, which limited its absorption by the roots. Moreover, the diffusion rate of P was lower than other macronutrients such as K (Schachtman *et al.*, 1998).

The K concentration in fruits was 8.3% and 3.6% higher than the control at 70 and 90 dat with 10 Gy. Interestingly, at 130 dat, the 120 Gy dose significantly increased the K concentration in fruits (Table 1). Similar results were reported in wheat leaves and stems at 90, 115, 135 and 160 days after sowing (das), since the K concentration was stimulated by radiation; however, the highest values were observed during the early stage of the evaluation (i.e. at 90 das) (Singh and Datta, 2010). In wheat irradiated with low doses (5 and 20 Gy), there was a higher K concentration in roots

and shoots. This proves that these treatments efficiently improve K absorption and translocation from roots to shoots (Singh *et al.*, 2013). Chickpea plants generated from seeds irradiated with  $^{60}\text{Co}$  at doses of 0.10 and 0.15 kGy showed 14% and 77% higher K concentration in mature fruits, respectively in comparison to control plants (Maity *et al.*, 2010). Rice (*Oryza sativa*) plants of the M<sub>2</sub> generation derived from seed irradiated with 150 Gy achieved a higher level of tolerance to salinity (75 mM NaCl) than their parents. They also had higher concentrations of chlorophyll and K and less Na (Shereen *et al.*, 2009). In our study, the main effect of the OP of the nutrient solution on K concentration in fruits was significant in all sampling dates. At 70 dat, the -0.092 MPa OP increased the K concentration in fruits by 4.4% compared to the control. At 90 and 130 dat, - 0.108 MPa OP increased the K concentration in fruits by 7.6% and 6.5%, respectively, as compared to the control. Nevertheless, the OP of - 0.36 MPa in the nutrient solution, caused the lowest K concentration in chilhuacle fruits. K can easily be absorbed by roots and accumulates in plants at higher levels than are physiologically necessary. This accumulation is called “luxury consumption”. However, in crops such as tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper, the K requirement is high and greatly influences post-harvest fruit quality (Jones, 2016). Therefore, since the OP of - 0.036 MPa can cause K deficiencies (Table 1), fruit quality may be negatively affected by such OP tested.

The Ca concentration in fruits produced by plants derived from seeds treated with 80 Gy was statistically higher at 70 and 130 dat, while at 90 dat, there were no statistical differences among treatments (Table 1). Chickpea plants from seeds irradiated with doses of 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 kGy produce fruits with Ca concentrations that were three times higher than in the fruits of plants from seeds without irradiation (Maity *et al.*, 2010).

Unlike the other macronutrients analyzed, the Ca concentration had a negative relationship with increasing OP in the nutrient solution used. That is, higher concentrations of the solution led to lower Ca concentration in fruits, particularly at 70 and 130 dat (Table 1). The low Ca content in some plant organs, in general, is not the result of insufficient Ca absorption, but rather a problem of distribution of this nutrient within the plant tissues (Bangerth, 1979). Deficient Ca transport causes problems such

as apical rot in tomato, pepper and watermelon (*Citrullus lanatus*) fruits, since this element cannot be mobilized from mature fruits and hence is not redistributed through the phloem. This forces developing tissues to depend on the immediate supply of Ca from the xylem, which in turn depends on transport processes of the nutrient (White and Broadley, 2003).

The highest Mg concentration in fruits depended on both the radiation dose and the OP of the nutrient solution for all three periods of evaluation. The highest Mg concentration was during fruit development, i.e., at 70 dat (Table 1). The 120 Gy dose increased the Mg concentration in fruits by an average of 6% above the control at 70 and 130 dat (Table 1). In wheat shoots and roots from irradiated seeds, there were no significant differences in the Mg concentration compared to the control plants without irradiation (Singh *et al.*, 2013). In velvet bean, seed irradiation caused a decrease in Mg concentration for each increment in the radiation dose (Bhat *et al.*, 2008). The lowest OP (– 0.108 MPa) evaluated in our study significantly increased the Mg concentration in fruits by 10.4% and 17.7% at 70 and 90 dat, respectively, compared to the control (Table 1). However, the increase in salinity (7, 21, 37, 49, and 64 mM NaCl) in the nutrient solution, and consequently a reduction of OP, decreased the Mg concentration in tomato fruits (Giuffrida *et al.*, 2009).

Tables S2, S3 and S4 show the effect of the interaction of the study factors on the concentration of macronutrients in the fruit. Importantly, we observed significant interaction of the study factors on macronutrient concentrations in chilhuacle fruits. Likewise, a strong interaction between radiation doses (ultraviolet or gamma radiation) and mineral nutrition has also been observed in common beans (*Phaseolus vulgaris*), mung bean (*Vigna radiata*), and wheat (Agrawal *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2013).

At 70 dat, the fruits showed higher N concentrations in treatments resulting from the combination of 10 Gy and – 0.036 MPa, as well as 80 Gy and – 0.108 MPa, while the highest P and K concentrations were recorded in the treatment with 120 Gy and – 0.108 MPa. The highest fruit Ca concentration was observed in plants derived from seed irrigated with a nutrient solution with an OP of – 0.036 MPa and seeds irradiated with both 10 and 80 Gy. Mg was the only macronutrient that recorded a higher concentration in non-irradiated seeds in this assay, particularly with – 0.092 MPa.

However, in non-irradiated seeds with an OP of  $-0.072$  MPa, Mg exhibited the lowest concentration in comparison to the other treatments tested. Likewise, at 70 dat, the treatment with an OP of  $-0.072$  MPa and plants from non-irradiated seeds had the lowest P, K and Mg concentrations in fruits (Table S2).

**Table 2.** N, P, K, Ca and Mg concentrations (g kg<sup>-1</sup> dry matter) in chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits at 70 dat in response to the effect of the interaction between gamma radiation (Gy) doses and osmotic potential of the nutrient solution (OP; MPa).

Dose (Gy)	OP (MPa)	N	P	K	Ca	Mg
0	-0.036	45.266 ± 14.96 ab	4.037 ± 0.14 f	9.718 ± 0.78 l	0.725 ± 0.06 cdef	2.148 ± 0.16 k
0	-0.072	61.833 ± 14.72 ab	2.910 ± 0.07 p	8.038 ± 0.31 p	0.886 ± 0.04 abc	1.588 ± 0.02 p
0	-0.092	72.566 ± 30.86 ab	4.405 ± 0.23 e	12.606 ± 0.60 b	0.751 ± 0.05 cde	3.00 ± 0.11 a
0	-0.108	38.733 ± 17.98 ab	3.349 ± 0.32 o	9.796 ± 1.15 k	0.829 ± 0.17 bcde	2.032 ± 0.35 m
10	-0.036	77.700 ± 18.63 a	3.942 ± 0.22 i	11.933 ± 1.01 d	1.081 ± 0.26 a	1.947 ± 0.10 n
10	-0.072	47.133 ± 23.45 ab	5.109 ± 0.61 c	12.298 ± 1.50 c	0.851 ± 0.27 bcd	2.414 ± 0.31 d
10	-0.092	59.500 ± 12.12 ab	3.917 ± 0.08 k	9.952 ± 0.09 j	0.651 ± 0.06 efg	2.171 ± 0.09 i
10	-0.108	35.000 ± 27.11 ab	3.921 ± 0.10 j	9.301 ± 0.44 n	0.748 ± 0.24 cde	2.394 ± 0.16 e
80	-0.036	45.256 ± 26.42 ab	3.606 ± 0.13 m	9.584 ± 0.40 m	1.082 ± 0.31 a	2.069 ± 0.10 l
80	-0.072	63.933 ± 27.91 ab	4.017 ± 0.06 g	10.942 ± 0.07 g	0.684 ± 0.03 defg	2.426 ± 0.00 c
80	-0.092	29.166 ± 28.43 ab	5.256 ± 0.21 b	11.674 ± 0.60 e	0.983 ± 0.26 ab	2.225 ± 0.11 h
80	-0.108	75.833 ± 26.05 a	4.822 ± 0.21 d	11.178 ± 0.44 f	0.762 ± 0.01 cde	2.170 ± 0.04 j
120	-0.036	47.600 ± 27.46 ab	3.430 ± 0.18 n	10.058 ± 0.41 i	0.877 ± 0.36 bcd	2.351 ± 0.08 f
120	-0.072	66.733 ± 17.06 ab	4.013 ± 0.17 h	10.823 ± 0.38 h	0.508 ± 0.07 g	2.266 ± 0.15 g
120	-0.092	25.900 ± 7.70 b	3.700 ± 0.66 l	8.847 ± 1.30 o	0.756 ± 0.28 cde	1.902 ± 0.27 o
120	-0.108	65.566 ± 22.76 ab	5.395 ± 0.17 a	12.642 ± 0.42 a	0.544 ± 0.03 fg	2.803 ± 0.08 b

Values with distinct letters in each column are statistically different (Tukey, 0.05)

**Table 3.** N, P, K, Ca and Mg concentrations ( $\text{g kg}^{-1}$  dry matter) in chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits at 90 dat from the effect of the interaction between gamma radiation (Gy) doses and osmotic potential of the nutrient solution (OP MPa).

Dose (Gy)	OP (MPa)	N	P	K	Ca	Mg
0	-0.036	19.366 ± 1.76 n	3.304 ± 0.09 m	11.785 ± 0.41 h	1.196 ± 0.27 a	1.591 ± 0.08 n
0	-0.072	29.866 ± 10.76 m	3.053 ± 0.09 p	10.843 ± 0.38 l	0.869 ± 0.13 a	1.490 ± 0.06 p
0	-0.092	62.766 ± 8.86 e	3.146 ± 0.01 n	11.889 ± 0.24 g	0.906 ± 0.03 a	1.843 ± 0.05 g
0	-0.108	37.333 ± 25.06 k	3.623 ± 0.43 k	11.345 ± 1.21 j	1.024 ± 0.11 a	1.962 ± 0.21 f
10	-0.036	54.133 ± 18.27 g	4.193 ± 0.13 e	12.562 ± 1.23 a	0.977 ± 0.08 a	1.801 ± 0.07 i
10	-0.072	68.366 ± 30.40 b	3.479 ± 0.35 l	10.516 ± 0.86 m	1.029 ± 0.20 a	1.723 ± 0.11 l
10	-0.092	45.266 ± 16.18 i	4.264 ± 0.40 b	11.986 ± 1.22 e	1.000 ± 0.23 a	1.764 ± 0.15 k
10	-0.108	70.476 ± 10.71 a	4.226 ± 0.24 c	12.431 ± 0.38 b	0.924 ± 0.01 a	1.695 ± 0.08 m
80	-0.036	29.866 ± 9.55 m	3.132 ± 0.32 o	10.275 ± 1.03 o	0.956 ± 0.11 a	1.520 ± 0.10 o
80	-0.072	66.033 ± 12.76 d	4.353 ± 0.54 a	11.710 ± 0.97 i	0.916 ± 0.31 a	2.501 ± 0.24 a
80	-0.092	38.266 ± 20.55 j	3.848 ± 0.25 h	11.275 ± 0.19 k	1.011 ± 0.11 a	2.076 ± 0.28 d
80	-0.108	54.376 ± 14.38 f	3.866 ± 0.12 g	12.117 ± 0.50 c	0.945 ± 0.08 a	2.113 ± 0.20 b
120	-0.036	32.66 ± 21.02 l	3.633 ± 0.14 j	9.863 ± 0.74 p	0.961 ± 0.17 a	1.773 ± 0.10 j
120	-0.072	49.000 ± 17.16 h	4.039 ± 0.39 f	11.975 ± 1.32 f	1.048 ± 0.14 a	2.006 ± 0.48 e
120	-0.092	66.976 ± 18.90 c	3.719 ± 0.16 i	10.363 ± 0.25 n	0.929 ± 0.26 a	1.827 ± 0.04 h
120	-0.108	15.633 ± 3.59 o	4.222 ± 0.57 d	11.990 ± 0.83 d	0.976 ± 0.07 a	2.101 ± 0.46 c

Values with distinct letters in each column are statistically different (Tukey, 0.05)



**Table 4.** N, P, K, Ca and Mg concentrations ( $\text{g kg}^{-1}$  dry matter) in chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits at 130 dat from the effect of the interaction between gamma radiation (Gy) doses and osmotic potential of the nutrient solution (OP MPa).

Dose (Gy)	OP (MPa)	N	P	K	Ca	Mg
0	-0.036	15.225 ± 1.29 l	4.024 ± 0.12 l	7.451 ± 0.31 p	1.394 ± 0.18 c	1.691 ± 0.09 m
0	-0.072	16.531 ± 2.26 h	3.941 ± 0.04 n	8.573 ± 0.19 m	1.209 ± 0.08 h	2.118 ± 0.03 a
0	-0.092	18.165 ± 1.76 e	4.711 ± 0.09 f	9.529 ± 0.08 h	1.334 ± 0.16 d	1.969 ± 0.08 g
0	-0.108	14.898 ± 0.28 m	3.994 ± 0.10 m	8.326 ± 0.15 o	1.246 ± 0.06 g	1.707 ± 0.05 l
10	-0.036	15.551 ± 1.02 i	4.262 ± 0.02 j	8.483 ± 0.00 n	1.187 ± 0.01 l	1.895 ± 0.00 i
10	-0.072	20.778 ± 3.18 b	5.102 ± 0.07 b	9.292 ± 0.43 i	1.104 ± 0.21 m	2.041 ± 0.07 c
10	-0.092	15.225 ± 1.29 l	3.555 ± 0.18 p	9.087 ± 0.34 j	1.204 ± 0.06 i	1.796 ± 0.07 k
10	-0.108	18.818 ± 1.13 d	5.144 ± 0.04 a	11.371 ± 0.45 a	1.039 ± 0.06 p	1.684 ± 0.02 o
80	-0.036	15.551 ± 0.56 i	4.415 ± 0.21 h	8.754 ± 0.15 l	1.304 ± 0.03 e	1.688 ± 0.03 n
80	-0.072	15.225 ± 1.47 k	5.059 ± 0.06 c	8.910 ± 0.30 k	1.865 ± 0.05 a	1.925 ± 0.01 h
80	-0.092	19.308 ± 1.41 c	4.316 ± 0.15 i	9.818 ± 0.74 f	1.250 ± 0.94 f	1.986 ± 0.10 f
80	-0.108	18.165 ± 0.98 f	3.873 ± 0.12 o	9.971 ± 0.51 e	1.043 ± 0.02 o	1.545 ± 0.03 p
120	-0.036	13.591 ± 1.23 n	4.487 ± 0.13 g	9.544 ± 0.05 g	1.842 ± 0.05 b	2.035 ± 0.04 d
120	-0.072	17.185 ± 0.84 g	4.217 ± 0.32 k	10.183 ± 0.14 d	1.189 ± 0.14 k	1.810 ± 0.11 j
120	-0.092	15.470 ± 0.64 j	5.022 ± 0.28 e	10.999 ± 0.26 b	1.048 ± 0.07 n	2.100 ± 0.11 b
120	-0.108	25.025 ± 1.76 a	5.057 ± 0.15 d	10.207 ± 0.08 c	1.192 ± 0.08 j	1.995 ± 0.01 e

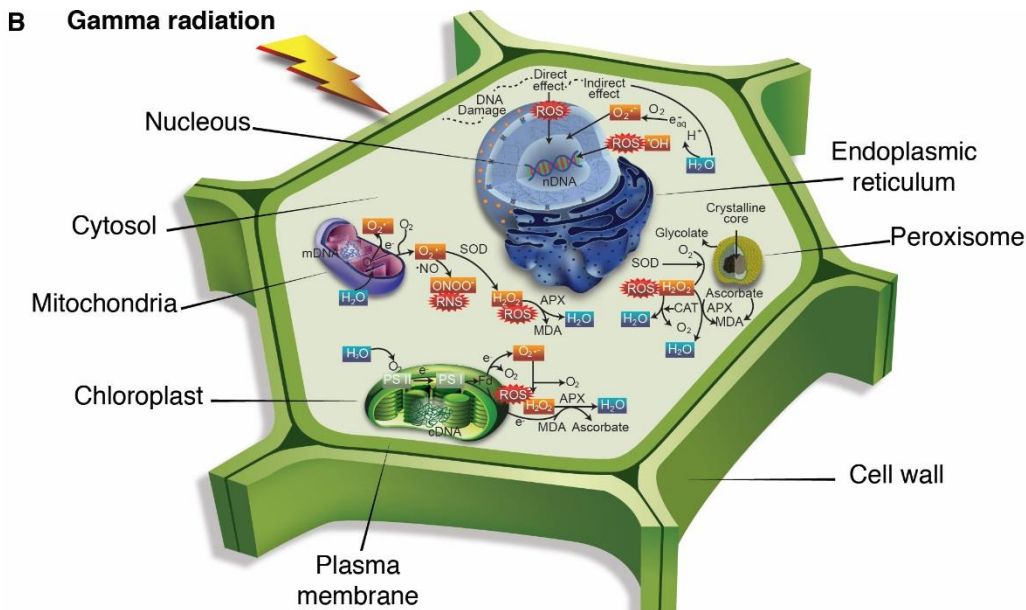
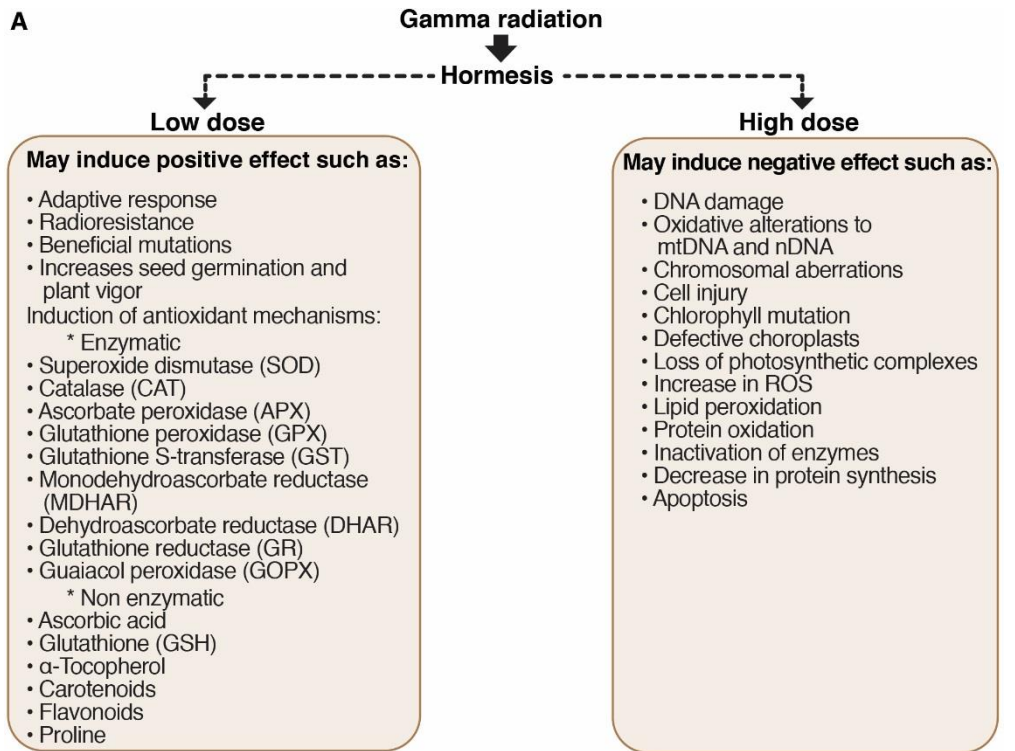
Values with distinct letters in each column are statistically different (Tukey, 0.05).

After 90 days of treatment, the interaction of the study factors had no significant effects on the Ca concentration in fruits. On the other hand, treatments with irradiation of 10 Gy and OP values of – 0.108 and – 0.036 MPa showed the highest N and K concentrations. The irradiation treatment with 80 Gy and – 0.072 MPa had the highest P concentration in fruits. As in the previous sampling date, a negative effect for P and Mg concentrations was observed in fruits of plants exposed to – 0.072 MPa as well as in those of control plants (Table S3).

The highest N concentrations were recorded in the treatment with an OP of – 0.108 MPa and 120 Gy. Additionally, for the same OP value and GR dose of 10 Gy, the highest P and K concentrations were recorded. In the case of Ca, the concentration increased significantly in fruits under 80 Gy GR and – 0.072 MPa OP. In this last evaluation, as in the evaluation at 70 dat, Mg had the highest concentration in fruits of plants derived from non-irradiated seeds, in this case grown with an OP of – 0.072 MPa (Table S4).

Gamma radiation produces free radicals in the cell when it interacting with atoms or molecules, which can damage or modify cell components ([Ali et al., 2015](#); [Singh et al., 2013](#)). Ionizing radiation can interfere in the whole plant metabolism and, importantly, modify the DNA double helix directly or indirectly through H<sub>2</sub>O radiolysis ([Azzam et al., 2012](#)). To counteract possible negative effects this, various signaling pathways are activated to repair damage in the DNA molecules, induce permanent changes or provoke cell death ([Azzam et al., 2012](#)). In chloroplasts, the photosystems PSI and PSII are the main sites for the production of the reactive oxygen species (ROS) singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) and superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). In mitochondria, complex I, ubiquinone and complex III of the electron transport chain (ETC) are the main sites of O<sub>2</sub><sup>-</sup> attack ([Gill and Tuteja, 2010](#)). Peroxisomes of plant cells are probably the major sites of intracellular production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ([Apel and Hirt, 2004](#); [del Río et al., 2006](#); [Sharma et al., 2012](#)). To prevent cell damage, plant cells have very efficient ROS removal enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione peroxidase (GPX), guaiacol

peroxidase (GPOX) and glutathione-S-transferase (GST). Furthermore, plant cells rely on non-enzymatic antioxidant compounds such as ascorbic acid (ASH), glutathione (GSH), phenols, non-protein amino acids and  $\alpha$ -tocopherols to overcome oxidative stress triggered by ionizing radiation (Foyer and Noctor, 2003; Gill and Tutej, 2010; Mittler *et al.*, 2004). In *A. thaliana*, application of gamma radiation at low dose increased the photosynthetic efficiency of the PSII and the maximal electron transport rate (ETR<sub>max</sub>), suggesting that roots are more sensitive to radiations than leaves (Vanhoudt *et al.*, 2014). In wheat, the combined effect of UV-B radiation and the availability of high levels of nutrients in the soil stimulates the accumulation and translocation of nutrients (Rathore and Agrawal, 2014). Maintaining an optimal supply of N, P and K may decrease the negative impact of UV-B radiation in wheat and mung bean (Agrawal and Rathore, 2007). In soybean (*Glycine max*), the concentrations of Fe, Cu and Zn increased as the gamma radiation dose increased (Alikamanoglu *et al.*, 2011). In alfalfa, the K content in the aerial parts was greater than in the roots of plants subjected to gamma radiation and salinity (Rejili *et al.*, 2008). Based on the aforementioned, Fig. 2 depicts possible direct and indirect modifications in plant cells caused by ionizing radiation that, together with differing osmotic potential levels in the nutrient solution, can alter nutrient concentrations and fruit quality.

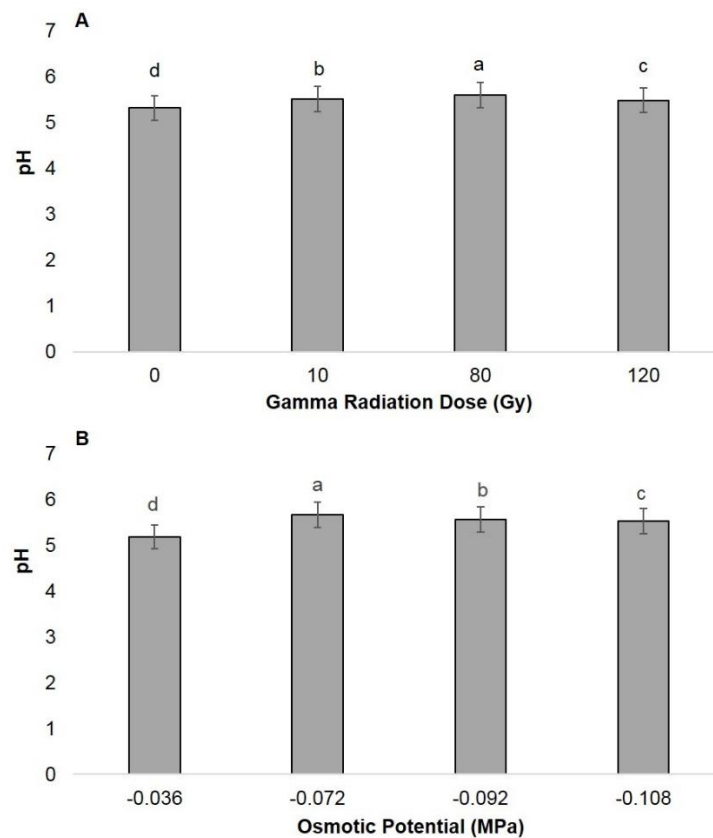


**Figure 2.** Schematic diagram of the influence of gamma radiation and osmotic potential on plant nutrition and fruit quality. **A** Dual (positive and negative) effects of gamma radiation on plants. **B** Gamma radiation with <sup>60</sup>Co on seeds and its possible direct effects on the DNA double helix and indirect effects through radiolysis of cell with the water. ROS also occur in various metabolic pathways located in various cellular compartments such as chloroplasts,

mitochondria and peroxisomes. Activation of both enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems may counteract ROS boots.

### 5.3.2. pH and EC in fruit pulp

Significantly higher pH values (pH 5.6) were observed in the fruit pulp of chilhuacle pepper derived from seeds exposed 80 Gy, although this value is very close to the control (pH 5.3) (Figure 3B).



**Figure 3.** Effect of gamma radiation and osmotic potential on the pH of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. **A** pH values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of gamma radiation doses to seeds. **B** pH values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of the osmotic potential of the nutrient solution. Means  $\pm$  SD with distinct letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05).

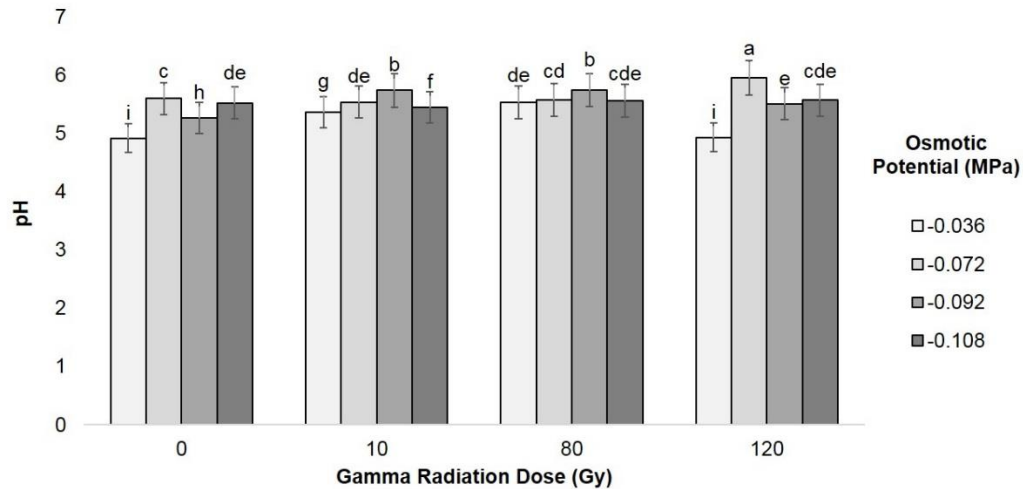
Ripe mango (*Mangifera indica*) fruits cv. Tommy irradiated with 0.25 and 0.35 kGy showed less damage from the pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, while the pulp quality properties, including pH, were not affected by the radiation (Santos et

*al.*, 2015). However, when irradiating mangoes with 1.0 kGy, pH increases, while titratable acidity decreases, and maturation slows, thus improving shelf life (Hossain *et al.*, 2014). It is worth mentioning that the aim of this study was to explore the effect of gamma radiation on the maintenance or improvement of the postharvest quality of mango fruits, which were produced by un-irradiated seeds or plants. Therefore, whether mutant plants derived from seeds or plants tissues cultures exposed to gamma radiation produce fruits with improved pH values remained to be elucidated. To the best of our knowledge, the present study demonstrates for the first time that chilhuacle fruits derived from plants produced by <sup>60</sup>Co-irradiated seeds exhibit changes in pH values. Under our experimental conditions, the highest pH value in fruit pulp was obtained with an OP in the nutrients solution of – 0.072 MPa (Fig. 3B). As N levels (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) increase in the nutrient solution and thus the OP values as well, the pH increases in the fruit extracts of pepper cv. 7180 (Yasuor *et al.*, 2013). However, when salinity (29 mM NaCl) in thus the OP increased in the nutrient solution, decreases in pH values of watermelon fruits were observed (Colla *et al.*, 2006). Therefore, different responses may be observed according to the plant genotype evaluated. The treatment resulting from the combination of a 120 Gy radiation dose and OP of – 0.072 MPa caused the highest pH in fruits. The lowest pH in fruit was found with an OP of – 0.036 MPa and plants from seeds irradiated with 120 Gy and without radiation (Fig. 4). Nevertheless, the application of increasing levels of N (32, 80, 160, and 320 kg ha<sup>-1</sup>) that in turn might have raised the OP value in the soil solution, did not affect the pH of fruit pulp of habanero pepper (*Capsicum chinense*) (Nuñez-Ramírez *et al.*, 2011).

Electrical conductivity (EC) in the fruit pulp of chilhuacle pepper significantly decreased when the seeds were irradiated compared to the control. Decreases in the EC values were 8.3%, 14.8%, and 5.1% in treatments with radiation doses of 10, 80 and 120 Gy, respectively (Fig. 5A).

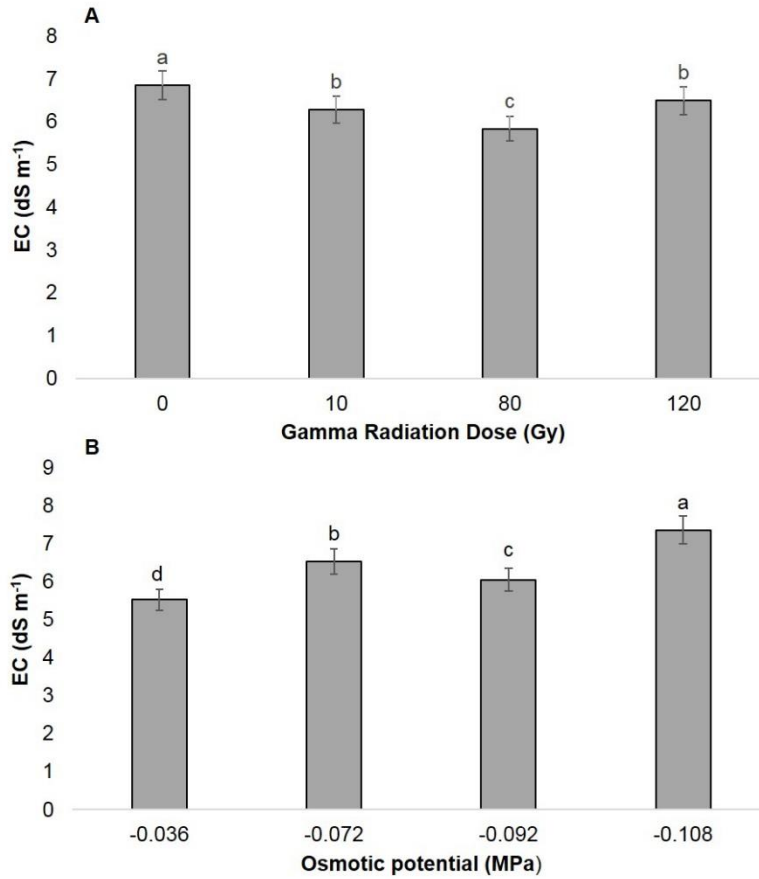
A higher concentration of salts in the nutrient solution significantly affected EC in fruit pulp. With respect to the OP of – 0.036 MPa, the increase in EC in fruit was 18.3%, 9.4%, and 33.2% with OP values in the nutrient solution of – 0.072, – 0.092, and – 0.108 MPa, respectively (Fig. 5b). Salinity levels (2 and 5.2 dS m<sup>-1</sup>) in the

nutrient solution affected EC in watermelon pulp (Colla *et al.*, 2006). In muskmelon (*Cucumis melo*), the EC of the pulp is affected by salinity (4, 6, and 8 dS m<sup>-1</sup>) and by the time of exposure to saline stress (56 and 71 dat) (Del Amor *et al.*, 1999).



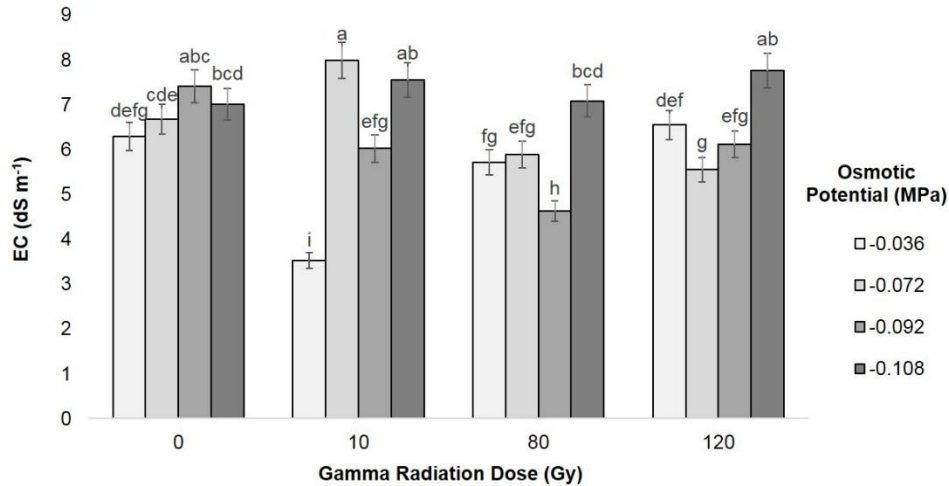
**Figure 4.** Effect of the interaction of study factors: gamma radiation on seeds and osmotic potential of the nutrient solution on the pH of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. Means ± SD with distinct letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05).

The EC of the fruit pulp was significantly affected by the interaction of study factors. The highest EC values were observed in the treatment with 10 Gy and – 0.072 MPa (Fig. 6). Furthermore, it has been found that gamma radiation affects other important traits in pepper fruits, such as capsaicin and dihydrocapsaicin concentration (Topuz and Ozdemir, 2004). Additionally, pepper seed (*Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*) irradiated with fast neutrons for different exposure times favored yield through an increase in the number of fruits per plant, number of seeds per fruit, fruit length and weight (Falusi *et al.*, 2012).



**Figure 5.** Effect of gamma radiation and osmotic potential on the electrical conductivity (EC) of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. **A** EC values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of gamma radiation on seeds. **B** EC values in chilhuacle pepper fruits in response to the effect of osmotic potential of the nutrient solution. Means  $\pm$  SD with different letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05).





**Figure 6.** Effect of the interaction of the study factors, that is, gamma radiation doses on seeds and osmotic potential of the nutrient solution, on the EC of chilhuacle pepper (*Capsicum annuum*) fruits. Means  $\pm$  SD with distinct letters in each subfigure indicate significant differences (Tukey, 0.05).

Importantly, pepper mutants may exhibit higher concentrations of  $\beta$ -carotene, P, Ca, Mg, S, Fe, Mn and Zn, in comparison to their parents (Tomlekova *et al.*, 2017). Nevertheless, the development of new pepper genotypes exhibiting higher yield and quality, as well as improved tolerance and resistance to biotic and abiotic stress agents, still remains as a daunting task (Do Rêgo *et al.*, 2011; Do Rêgo *et al.*, 2016; García-Gaytán *et al.*, 2017).

#### 5.4. CONCLUSIONS

The results obtained herein provide evidence that gamma radiation applied to chilhuacle pepper seeds before sowing, as well as the osmotic potential of the nutrient solution used to grow the plant, influence the macronutrient concentration and quality indicators such as pH and EC in the fruits. In particular, irradiating the chilhuacle pepper seeds with the <sup>60</sup>Co isotope enhanced macronutrient concentrations in the fruits. Likewise, a decrease in the OP of the nutrient solution increased the macronutrient concentration in the fruits, with the exception of Ca. With regard to fruit quality, all levels of gamma radiation applied to the seeds caused an increase in the pH of the fruits derived from these seeds. When the osmotic

potential of the nutrient solution decreased, fruit acidity also decreased. The EC of the fruits increased due to the effect of the radiation, while decreasing the OP increased EC in the fruits. In conclusion, gamma radiation, the OP of the nutrient solution, and their interaction all affect the macronutrient concentrations, pH and EC in chilhuacle pepper fruits. Though a plethora of studies on the individual effect of gamma radiation and osmotic potential on plant biology have been conducted in recent year, to the best of our knowledge, this is the report addressing the simple and combined effects of such factor on nutrient concentration, pH and EC of peppers. In addition, we are helping to increase the genetic variability and to generate technical and practical information to improve the production of this crop. Nevertheless, the biochemical, physiological and molecular mechanisms underlying the response observed remain to be further investigated.

### **Acknowledgements**

We thank the Laboratory of Plant Nutrition from Colegio de Postgraduados Campus Montecillo for the facilities provided to perform our experiments. We also thank the National Council for Science and Technology (CONACYT) from Mexico, for the doctorate scholarship granted to VGG.

### **5.5. LITERATURE CITED**

- Abbas, H.H., I. M. Farid, S. M. Soliman, I. G. M. Galal, M. M. Ismail, E. A. Kotb, and S. H. Moslhy.** 2015. Growth and some macronutrients uptake by castor bean irradiated with gamma ray and irrigated with wastewater under sandy soil condition. *Journal Soil Science and Agricultural Engineering, Mansoura University*, 6:433-444.
- Agrawal, S. B. and D. Rathore.** 2007. Changes in oxidative stress defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) cultivars grown with and without mineral nutrients and irradiated by supplemental ultraviolet-B. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 21-33.
- Agrawal, S. B., D. Rathore, and A. Singh.** 2006. Combined effects of enhanced ultraviolet-B radiation and mineral nutrients on growth, biomass accumulation

and yield characteristics of two cultivars of *Vigna radiata* L. *Journal of Environmental Biology*, 27: 55.

- Ahloowalia, B. S., M. Maluszynski and Nichterlein, K.** 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135: 187-204.
- Albu-Yaron, A., A. Feigin, and I. Rylski.** 1993. The quality of tomato for canning as affected by combined chloride, nitrate and osmotic potential of nutrient solution. *Plant Foods for Human Nutrition*, 43:201-210.
- Ali, H., Z. Ghorri, S. Sheikh, and A. Gul.** 2015. Effects of gamma radiation on crop production. In: *Crop Production and Global Environmental Issues*. Springer, International Publishing.
- Alikamanoglu, S., O. Yaycili, and A. Sen.** 2011. Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). *Biological trace element research*, 141: 283-293.
- Amja, M. and M.A. Anjum.** 2003. Effect of post-irradiation storage on the radiation-induced damage in onion seeds. *Asian Journal of Plant Science*, 2:702-707.
- Apel, K. and H. Hirt.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*, 55: 373-399.
- Azzam, E. I., J. P. Jay-Gerin, and D. Pain.** 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, 327: 48-60.
- Bajaj, Y. P. S.** 1970. Effect of gamma-irradiation on growth, RNA, protein, and nitrogen contents of bean callus culture. *Annals of Botany*, 34:1089-1096.
- Bangerth, F.** 1979. Calcium-related physiological disorders of plants. *Annual review of phytopathology*, 17: 97-122.
- Bank, T. L., R. K. Kukkadapu, A. S. Madden, M. A. Gilder-Vogel, M. E. Baldwin, and P. M. Jardine.** 2008. Effect of gamma-sterilization on the physico-chemical properties of natural sediments. *Chemical Geology*, 251: 1-7.
- Bhat, R., K. R. Sridhar, C. C. Young, A. A. Bhagwath and S. Ganesh.** 2008. Composition and functional properties of raw and electron beam-irradiated

*Mucuna pruriens* seeds. International journal of food science and technology, 43: 1338-1351.

- Bremner, J.** 1965. Total nitrogen. Methods of soil analysis Part 2 Chemical and microbiological properties: Madison, WI, USA: American Society of Agronomy Inc. Publisher, pp. 1149-1178.
- Burgos, C. F.** 1964. The effect of gamma radiation on soil nitrogen, phosphorus and organic matter. Ceiba, 10: 53-55.
- Cawse, P. A.** 1967. Effect of low sub-sterilising dose of gamma radiation on carbon, nitrogen and phosphorus in fresh soils. Journal Science Food Agricultural, 18:388-391.
- Chart RC.** 2015. London, UK. (6th Ed.) London, UK edn., The Royal Horticultural Society.
- Choudhary, K. K. and S. B Agrawal.** 2014. Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. Environmental and experimental botany, 99: 122-132.
- Colla, G., Y. Roupahel, M. Cardarelli, and E. Rea.** 2006. Effect of salinity on yield, fruit quality, leaf gas exchange, and mineral composition of grafted watermelon plants. HortScience, 41: 622-627.
- Del Amor, F. M., V. Martinez, and A. Cerda.** 1999. Salinity duration and concentration affect fruit yield and quality, and growth and mineral composition of melon plants grown in perlite. HortScience, 34: 1234-1237.
- Do Rêgo, E. R., M. M. do Rêgo and F. L. Finger.** 2016. Production and breeding of chilli peppers (*Capsicum* spp.). Cham, Switzerland, Springer.
- Do Rêgo, E. R., M. M. Do Rêgo, C. D. Cruz., F. L. Finger and V. W. D. Casali.** 2011. Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). Genetic Resources and Crop Evolution, 58: 909-918.
- Eno, C. F. and H. Popenoe.** 1963. The effect of gamma radiation on the availability of nitrogen and phosphorus in soil. Soil Science Society of America Journal, 27: 299-301.

- Falusi, O. A., O. A. Y. Daudu, and J. A. T. da Silva.** 2012. Effect of exposure time of fast neutron irradiation on growth and yield parameters of *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*. *African Journal of Plant Science*, 6: 251-255.
- Foyer, C. H. and G. Noctor.** 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*, 119: 355-364.
- García-Gaytán, V., F.C. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, G. A. Baca-Castillo and S. García-Morales.** 2017. The Chilhuacle Chili (*Capsicum annum* L.) in Mexico: Description of the Variety, Its Cultivation, and Uses. *International Journal of Agronomy*, 2017.
- Gill, S. S. and N. Tuteja.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48: 909-930.
- Giuffrida, F., M. Martorana, and C. Leonardi.** 2009. How sodium chloride concentration in the nutrient solution influences the mineral composition of tomato leaves and fruits. *HortScience*, 44: 707-711.
- Hamideldin, N., and O. S. Hussien.** 2013. Morphological, physiological and molecular changes in *Solanum tuberosum* L. in response to pre-sowing tuber irradiation by gamma rays. *American Journal of Food Science and Technology*, 1: 36-41.
- Hassan, A. B., G. A. Osman, M. A. Rushdi, M. M. Eltayeb and E. E. Diab.** 2009. Effect of gamma irradiation on the nutritional quality of maize cultivars (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) grains. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8: 167-171.
- Hossain, F., A. K. Parvez, M. K. Munshi, I. Khalil and R. Huque.** 2014. Postharvest treatments of radiation and chemical on organoleptic and biochemical properties of mango (*Mangifera indica* L.) In relation to delay ripening. *American-Eurasian Journal of Agricultural Environmental Science*, 14: 555-564.
- Iqbal, J.** 1976. Cell populations effects on levels of nucleic acids (DNA & RNA) in irradiated shoot apices of *Capsicum annum* L. seedlings. *Biologia*, 22:61-66.

- Jones Jr J.B.** 2016. Hydroponics: a practical guide for the soilless grower. Boca Raton, FL, USA, CRC press.
- Jones, H.E., H. M. West, P. M. Chamberlain, N.R. Parekh, N. A. Beresford and N. M.J. Crout.** 2004. Effect of gamma irradiation on *Holcus lanatus* (Yorkshire fog grass) and associated soil microorganisms. Journal of Environmental Radioactivity, 74: 57-71.
- Ling, A. P. K., Y. C. Ung, S. Hussein, A. R. Harun, A. Tanaka, and H. Yoshihiro.** 2013. Morphological and biochemical response of *Oryza sativa* L. (cultivar MR219) to ion beam irradiation. Journal Zhejiang University, 14: 1132-1143.
- Luis, A., L. M. Sandalio, F. J. Corpas, J. M. Palma, and J. B. Barroso.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant physiology, 141: 330-335.
- Luque, A. A. and F. T. Bingham.** 1981. The effect of the osmotic potential and specific ion concentration of the nutrient solution on the uptake and reduction of nitrate by barley seedlings. Plant and Soil, 63: 227-237.
- Maity, J. P., S. Kar, A. Chakraborty, M. Sudershan, and S. C. Santra.** 2010. Study on trace elements (using energy dispersive X-ray fluorescence technique) of edible seeds from *Cicer arietinum* L. plants developed from gamma irradiated seeds and variation of yielding capacity. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 283: 225-230.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in plant science, 9: 490-498.
- Mohajer, S., R. Mat Taha, M. M. Lay, A. Khorasani Esmaeili and M. Khalili.** 2014. Stimulatory effects of gamma irradiation on phytochemical properties, mitotic behaviour, and nutritional composition of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). The Scientific World Journal, 2014.
- Moussa, H. R.** 2006. Gamma irradiation regulation of nitrate level in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. Journal of New Seeds, 8: 91-100.
- Nassar, A. H., M. F. Hashim, N. S. Hassa, H. Abo-Zaid.** 2004. Effect of gamma irradiation and phosphorus on growth and oil production of chamomile

(*Chamomilla recutita* L. Rausechert). International Journal Agriculture and Biology, 6:776-780.

- Nguyen, N. T., S.A.McInturf, and D.G. Mendoza-Cózatl.** 2016. Hydroponics: a versatile system to study nutrient allocation and plant response to nutrient available and exposure to toxic elements. Journal of Visualized Experiments, 113:e54317.
- Núñez-Ramírez, F., D. González-Mendoza, O. Grimaldo-Juárez, L. C. Díaz.** 2011 Nitrogen fertilization effect on antioxidants compounds in fruits of habanero chili pepper (*Capsicum chinense*). International Journal of Agricultural and Biology, 13: 827-830.
- Oladosu, Y., M. Y. Rafii, N. Abdullah, G. Hussin, A. Ramli, H. A Rahim and M. Usman.** 2016. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 30: 1-16.
- Qi, W., L. Zhang, H. Xu, L. Wang and Z. Jiao.** 2014. Physiological and molecular characterization of the enhanced salt tolerance induced by low-dose gamma irradiation in *Arabidopsis* seedlings. Biochemical and biophysical research communications, 450: 1010-1015.
- Rathore, D. and S. B. Agrawal.** 2014. Interactive effect of ultraviolet-B and mineral nutrients on accumulation and translocation of trace elements in wheat crop. Journal of Environmental Biology, 35: 505.
- Razavi, D. S. and A. Lakzian.** 2007. Evaluation of chemical and biological consequences of soil sterilization methods. Casp Journal of Environmental Sciences 5: 87-91.
- Rejili, M., D. Telahigue, B. Lachiheb, A Mrabet, and A. Ferchichi.** 2008. Impact of gamma radiation and salinity on growth and  $K^+/Na^+$  balance in two populations of *Medicago sativa* (L.) cultivar Gabès. Progress in Natural Science, 18: 1095-1105.
- Rennie, D. A. and S. H. Nelsol.** 1975. Low-dose irradiation of vegetable seeds: the effects on N and P uptake. Canadian Journal Plant Science, 55-761-769.

- Santos, A. M. G., S. R. O. Lins, J. M. D. Silva, and S. M. A. D. Oliveira.** 2015. Low doses of gamma radiation in the management of postharvest *Lasiodiplodia theobromae* in mangos. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 841-847.
- Schachtman, D. P., R. J. Reid, and S. M. Ayling.** 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiology*, 116: 447-453.
- Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey, and M. Pessarakli.** 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012.
- Shereen, A., R. Ansari, S. Mumtaz, H. R. Bughio, S. M. Mujtaba, M. U. Shirazi, and M. A. Khan.** 2009. Impact of gamma irradiation induced changes on growth and physiological responses of rice under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 2487-2495.
- Shiozaki, N., I. Hattori, R. Gojo and T. Tezuka.** 1999. Activation of growth and nodulation in a symbiotic system between pea plants and leguminous bacteria by near-UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 50: 33-37.
- Singh, B., and P. S. Datta.** 2010. Effect of low dose gamma irradiation on plant and grain nutrition of wheat. *Radiation Physics and Chemistry*, 79: 819-825.
- Singh, B., S. Ahuja, R. K. Singhal and P. V. Babu.** 2013. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 298: 249-257.
- Tikhonov, Y. B., V. P. Panarin, G. V. Alimova and N. B. Mikhailova.** 1980. Effect of gamma-irradiation of seeds on the productivity and nitrogen metabolism of *Datura innoxia*. *Rastit Resur*, 16: 237-242.
- Tomlekova, N. B.** 2010. Induced mutagenesis for crop improvement in Bulgaria. *Plant Mutation Reports*, 2: 4-27.
- Tomlekova, N. B., P. J. White, J. A. Thompson, E. A. Penchev and S. Nielen.** 2017. Mutation increasing  $\beta$ -carotene concentrations does not adversely affect concentrations of essential mineral elements in pepper fruit. *PloS one*, 12: e0172180.



- Topuz, A. and F. Ozdemir.** 2004. Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sun-dried and dehydrated paprika. *Food Chemistry*, 86: 509-515.
- Vanhoudt, N., N. Horemans, J. Wannijn, R. Nauts, M. Van Hees, and H. Vandenhove.** 2014. Primary stress responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to gamma radiation. *Journal of Environmental radioactivity*, 129: 1-6.
- White, P. J. and M. R. Broadley.** 2003. Calcium in plants. *Annals of botany*, 92: 487-511.
- Yasuor, H., A. Ben-Gal, U. Yermiyahu, E. Beit-Yannai, and S. Cohen.** 2013. Nitrogen management of greenhouse pepper production: Agronomic, nutritional, and environmental implications. *HortScience*, 48: 1241-124.
- Zham D. and Voloozh D.** 1976. The effect of pre-sowing gamma irradiation of seeds on the yield and productivity of outdoor tomatoes. *Biologia*, 31: 9-14.
- Zhang, S. S. Cui, X. Gong, L. Chang, S. Jia, X. Yang, D. Wu, and X. Zhang.** 2016. Effect of gamma irradiation on soil biological communities and C and N pools in a clay loam soil. *Applied Soil Ecology*, 108: 352-360.

## **CAPÍTULO VI.**

**CAPÍTULO VI.**  
**PRODUCCIÓN DE MUTANTES EN CHILE CHILHUACLE: CAMBIOS**  
**BROMATOLÓGICOS EN LA GENERACIÓN M<sub>1</sub> Y POLIMORFISMOS**  
**GENÉTICOS EN LA GENERACIÓN M<sub>2</sub>**

**Resumen**

El chile chilhuacle es conocido en la gastronomía internacional como especie culinaria en la elaboración del mole negro oaxaqueño. Su base genética está en peligro de extinción. En este estudio se probó el efecto de la radiación gamma (RG) en semillas (0, 10, 80, 120 Gy) y diferentes potenciales osmóticos (PO) (- 0.036, - 0.072, - 0.092, - 0.108 MPa), sobre la concentración de clorofilas, aminoácidos, azúcares, °Brix y micronutrientes en la generación M<sub>1</sub>, en hidroponía. Los mutantes obtenidas por RG se evaluaron en plántulas de la M<sub>2</sub>, con cinco marcadores RAPD. En la M<sub>1</sub> se observó una reducción de clorofilas con la RG. La RG de 120 Gy incrementó los aminoácidos en hojas 29.1%, mientras que con el PO -0.036 MPa favoreció la concentración de aminoácidos. Con 80 y 120 Gy se incrementó los azúcares en frutos en un 20.2 y 20.2%. El PO de - 0.036 MPa incrementó los azúcares en los frutos. Con 10 Gy, los sólidos solubles se incrementaron 29.8%. En hojas, fue el órgano con mayor concentración de Fe, Cu y Zn por efecto de RG y PO, respecto al tallo, ramas y frutos. En la M<sub>1</sub> se obtuvieron dos plantas mutantes (M10R y M120R) con frutos de color rojo. Un total de 57 fragmentos de PCR se amplificaron, 12 fragmentos (21.87%) revelaron polimorfismo con promedio de 2.4 bandas polimórficas por primers. Basado en el poder de resolución e índice de marcador, los primers D-20 y C-05 fueron más informativos. El dendograma UPGMA mostró dos grupos. En el primero los controles (WB, WR), el M10, M80 y M120 y el segundo grupo: M10R y M120R. Se concluye que la RG induce eficazmente mutaciones en chile chilhuacle y que los RAPD pueden utilizarse no sólo en diversidad genética, sino además en la correcta identificación de nuevos mutantes.

**Palabras clave:** chile chilhuacle, mole negro, radiación gamma, potencial osmótico, mutante

## 6.1. INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* (Solanaceae) comprende más de 30 especies, es originario de las Américas tropicales y subtropicales. A nivel mundial, la especie *C. annuum* es la más cultivada e importante desde el punto de vista económico. En México fue domesticada hace miles de años. La mayor concentración de la diversidad genética se ubica en Bolivia, Perú, Brasil y México. *Capsicum annuum* y presenta la mayor variación en tamaño, forma y color de frutos, entre ellos los frutos dulces y picantes (Hernández-Verdugo et al., 2001; Oyama et al., 2006; Wand y Bosland, 2006; Perry y Flannery, 2007; Clement et al., 2010). Los frutos tienen concentración de vitaminas A, B y E, carotenos, proteínas y minerales (Pruthi, 2003). El chile chilhuacle es endémico de la región Cañada en el Estado de Oaxaca, México, es reconocido en la gastronomía nacional e internacional como especie culinaria en la elaboración del mole negro oaxaqueño, platillo típico de la comida mexicana. Sin embargo, el desarrollo y generación de paquetes tecnológicos son prácticamente nulos, donde una serie de restricciones agronómicas al proceso de producción, así como la incidencia de plagas y enfermedades, obstaculizan el potencial rendimiento; además, la base genética del cultivo está muy restringida (García-Gaytán et al., 2016; García-Gaytán et al., 2017). El mejoramiento por mutación consiste en el desarrollo de nuevas variedades mediante la generación y utilización de la variabilidad genética a través de mutagénesis química y física (Oladosu et al., 2016). Las mutaciones inducidas siguen siendo de gran importancia en la creación de variedades de cultivos como cambios en la calidad de aceite, proteínas, almidón, mayor absorción de metales específicos, sistema radical con mayor capacidad de exploración, resistencia a la sequía y a enfermedades y tolerancia a la salinidad (Ahloowalia et al., 2004). Así mismo es una herramienta poderosa para crear nueva variación en cultivos con la variabilidad genética restringida (Parry et al., 2009). Los cambios observados en los cultivos a nivel morfológico, bioquímico y fisiológico por efecto de la RG dependen en gran medida

de las dosis y tiempo de exposición (De Micco *et al.*, 2011; Ahuja *et al.*, 2014). La mayoría de las poblaciones mutagenizadas se generan exponiendo las semillas ( $M_0$ ) al mutágeno y permitiendo que las plantas  $M_1$  resultantes producidas se autofecunden y den lugar a los individuos  $M_2$  (Parry *et al.*, 2009). En la generación  $M_1$  es posible identificar solo mutaciones dominantes, en la generación  $M_2$  la mutación se segregará generando homocigotos tanto para alelos recesivos o alelos dominantes (Roychowdhury y Tah, 2013). Cuando se induce mutaciones en *C. annuum* con mutágenos químicos, se ha observado en la generación  $M_1$  plantas con porte bajo, mientras que en la generación  $M_2$  se observaron mutaciones en el color de la hoja, arquitectura de la planta y hoja (Arisha *et al.*, 2014; Arisha *et al.*, 2015). En *Vigna unguiculata* detectaron mutantes deseables en la generación  $M_2$  y  $M_6$ , con características en su capacidad de floración, madurez temprana, coloración de flores y semillas, y rendimiento de granos (Horn *et al.*, 2016). Las mutaciones a nivel de clorofila se han utilizado como un índice para evaluar el potencial mutagénico (Khan y Tyagi, 2009), se han observado mutantes de clorofila en la generación  $M_2$  de *Glycine Max*, *Vignia radiata*, *Vicia faba*, *Cicer arietinum* y *Capsicum annuum* (Atak *et al.*, 2004; Sangsiri *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2008; Wani *et al.*, 2009; Devi *et al.*, 2011). Una alta radiación UV-B induce disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos y biomasa, sin embargo, los contenidos de enzimas antioxidantes se incrementan como sistema de defensa. También la protección es dada por pigmentos como los flavonoides y carotenoides, además de hormonas vegetales como el ácido jasmónico (Agrawal y Rathore, 2007; Choudhary y Agrawal, 2014).

La RG induce mejor la adaptación a la salinidad el cual se ve reflejado en incrementos en la concentración de aminoácidos y proteínas en *Ambrosia marítima* L. (Hussein *et al.*, 2012). Varias reacciones y regulaciones metabólicas vinculan directamente a los azúcares solubles con las tasas de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), respiración mitocondrial o regulación de la fotosíntesis y con procesos antioxidantes, como la ruta oxidativa pentosa-fosfato y la biosíntesis de carotenoides (Couée *et al.*, 2006). Análisis genéticos revelan una fuerte interacción entre el azúcar y la señalización hormonal de la planta, además de un

rol central para la hexokinasa (HXK) como sensor conservado de la glucosa (Rolland *et al.*, 2006). Los azúcares regulan la expresión de muchos genes a nivel transcripcional, en *A. thaliana* se ha demostrado que los azúcares inducen o reprimen la expresión de > 1800 genes incluyendo el gen *STP1* (Proteína Transportadora de Azúcar 1), que codifica un cotransportador H<sup>+</sup>/monosacárido (Cordoba *et al.*, 2014).

Al irradiar semillas de soya, el aumento de la dosis de RG, incrementó la concentración de hierro, cobre, zinc proteínas solubles y malondialdehído en plántulas (Alikamanoglu *et al.*, 2011). La RG produce mutantes con diferencias en concentraciones de minerales, azúcares solubles, antioxidantes y aminoácidos; y estos compuestos están estrechamente relacionados con el comportamiento fisiológico de la planta y su capacidad de adaptación a condiciones adversas como lo es la salinidad (Singh *et al.*, 2013).

La magnitud de los daños causado en la agricultura por diferentes factores, subraya la necesidad de desarrollar nuevos cultivos y plantas con tolerancia a una combinación de diferentes tipos de estrés, sin embargo, es necesario enfocarse en los aspectos moleculares, fisiológicos y metabólicos (Mittler, 2006; Mittler y Blumwald, 2010). El panorama de los efectos del cambio climático global sobre la agricultura en México podría reducir la producción agroalimentaria nacional 25.7% para el año 2080 (Moyer, 2010), por lo que es necesario adoptar medidas estratégicas pertinentes para abordar este fenómeno mundial. Los parientes silvestres de los cultivos domesticados poseen diversidad genética útil para desarrollar variedades más productivas, nutritivas y resistentes, sin embargo, su estado de conservación y disponibilidad para su uso también deben ser cuantificados (Castañeda-Álvarez *et al.*, 2016). Es posible validar las mutaciones inducidas por efecto de la RG con el uso de diferentes tipos de marcadores de ADN en *C. annuum*, tales como el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Mullainathan *et al.*, 2014; Aslam *et al.*, 2016). Se usó en detección de polimorfismos genéticos en especies como *Jatropha curcas* tratadas con RG (Dhillon *et al.*, 2014; Dhakshanamoorthy *et al.*, 2015), y ha servido para diferenciar de manera eficaz una

alta frecuencia de mutantes generados a partir de radiación ionizante (Lu *et al.*, 2007; Lee y Han, 2014).

El chile chilhuacle es una especie culinaria en la elaboración del mole negro oaxaqueño, sin embargo, posee una baja variabilidad genética. En este estudio se evaluó el efecto de la RG sobre los cambios en la concentración de clorofilas, azúcares, aminoácidos, sólidos solubles y micronutrientes en diferentes órganos de las plantas en la generación M<sub>1</sub> y la adaptación de las plantas a diferentes potenciales osmóticos de la solución nutritiva como un iniciador de cambios en la fisiología de los mutantes. Con la técnica RAPD fue posible determinar los polimorfismos genéticos en los mutantes de frutos con el pericarpio de color rojo de la generación M<sub>2</sub>, lo que sugiere la inducción de la variación genética en chile chilhuacle y el potencial de probar los nuevos materiales en la región Cañada del estado de Oaxaca con los pequeños productores.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Irradiación de semillas**

Frutos de chile chilhuacle (*Capsicum annuum*) fueron recolectados en la Región Cañada del Estado de Oaxaca, México, y fueron transportados a Texcoco, México. Las semillas se retiraron de la placenta de frutos deshidratados, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 20 min y se prosiguió a lavar las semillas con agua estéril tres veces. Lotes de 100 semillas previamente etiquetadas, se irradiaron en un irradiador Transelektro GLI-01 con el isótopo Co<sup>60</sup>, las dosis utilizadas fueron 10, 80 y 120 Gy por tratamiento, más un lote testigo sin irradiar. Las semillas fueron irradiadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), ubicado en La Marquesa, Ocoyoacac Estado de México.

### **6.2.2. Condiciones del experimento, germinación y trasplante**

La investigación se realizó en un invernadero de estructura de metal y plástico con una transmitancia de luminosidad del 50%, ubicada en las siguientes coordenadas: 19° 20' N.L., 98°53' W.L, 2250 m.a.s.l, en Texcoco estado de México. La temperatura media diurna fue de 23 °C y la nocturna de 13°C, con humedad

relativa de 65.4%. La germinación de semillas fue llevada a cabo en turba y puestas en un invernadero donde la temperatura fue de 30.5 y 15 °C como máxima y mínima, con humedad relativa de 60%. Cuando las plantas tenían cinco hojas verdaderas se realizó el trasplante; 40 días después de la germinación, se colocaron en un sistema hidropónico. Bolsas de polietileno de color negro con capacidad para 10 L fueron utilizadas como contenedores con orificios en la base que permitiera el drenaje, el sustrato utilizado en los contenedores fue roca volcánica porosa tezontle con una granulometría de 2 a 5 mm.

### **6.2.3. Valores del análisis físico y químico del sustrato**

Los valores de las propiedades físicas del tezontle utilizado fueron: densidad aparente ( $2.8 \text{ g cm}^3$ ), densidad real ( $1.15 \text{ g cm}^3$ ), espacio poroso total (59%). Los valores de las propiedades químicas en el tezontle fueron: pH (8.55), conductividad eléctrica ( $0.077 \text{ dS m}^{-1}$ ), capacidad de intercambio catiónico ( $3.41 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ), N total (0.027%), P ( $0.173 \text{ g kg}^{-1}$ ), K ( $0.173 \text{ g kg}^{-1}$ ), Ca ( $0.007 \text{ g kg}^{-1}$ ), Mg ( $0.004 \text{ g kg}^{-1}$ ), Fe ( $0.009 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), Mn (no detectado), B ( $0.136 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y Na ( $2.001 \text{ mg kg}^{-1}$ ), los resultados fueron el promedio de tres repeticiones. La densidad aparente (DA), la densidad real (DR) y el espacio poroso total (EPT) se calculó de acuerdo a los protocolo de [Martínez y Roca \(2011\)](#). El pH y conductividad eléctrica (CE) fueron determinados con el método de extracto en la pasta de saturación ([Warncke, 1986](#)). Se utilizó agua destilada como agente de extracción y agitación hasta alcanzar un punto de humedad característico en la superficie del sustrato. Para determinar las lecturas de pH se utilizó un potenciómetro OAKTON pH/mV °C meter, Series No. 43291. La CE se midió con un medidor de conductividad de mesa (Hanna, Mod. HI 4312). En el extracto de la pasta de saturación, los iones solubles (P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, B y Na) se cuantificaron por medio de plasma acoplado inductivamente por espectrometría de emisión atómica (ICP-OES Agilent, Model 725-OES; Mulgrave, Australia). El contenido de nitrógeno del sustrato se estimó mediante el método de micro-kjeldaghl ([Bremner, 1965](#)). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó con el método de acetato de sodio (NaOAC 1N pH 8.2).



#### **6.2.4. Potencial osmótico y solución nutritiva**

Fueron evaluados cuatro potenciales osmóticos (PO) (– 0.036, – 0.072, – 0.092 y – 0.108 MPa), las soluciones de nutrientes se formularon de acuerdo a la Solución Nutritiva Universal de [Steiner \(1984\)](#), donde la concentración al 100% en mol<sub>c</sub> m<sup>-3</sup> es 12.0 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1.0 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 7.0 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 7.0 K<sup>+</sup>, 9.0 Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, y 4.0 Mg<sup>2+</sup>, con un potencial osmótico de – 0.072 MPa. Las soluciones nutritivas se prepararon con sales grado reactivo de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub>. El pH de las soluciones se ajustó a 5.8 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Las soluciones nutritivas se complementaron con micronutrientes (Tradecorp AZ<sup>TM</sup>; Guadajara, Jalisco, México) en las siguientes concentraciones (mg L<sup>-1</sup>): 4.0 Fe; 2.33 Mn; 0.47 Zn; 0.19 Cu; 0.43 B y 0.17 Mo.

#### **6.2.5. Generación M<sub>1</sub>:**

##### **6.2.5.1. Parámetros de rendimiento**

En la generación M<sub>1</sub> se cuantificó, el número de frutos totales durante el ciclo del cultivo (NFT), peso de biomasa fresca de frutos (PBFF) (g), peso de biomasa seca de frutos (PBSF) (g), ancho de frutos (AF) (mm), longitud de frutos (LF) (mm).

##### **6.2.5.2. Clorofilas a y b y aminoácidos libres totales**

El contenido de clorofila (*a* y *b*) y de aminoácidos libres totales se realizó en hojas maduras de chile chilhuacle a los 130 días después del trasplante (ddt), bajo la metodología de extracción etanólica ([Geiger et al., 1998](#)). El material vegetal colectado en el invernadero fue inmediatamente congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C para su posterior análisis. Se pesó 60 mg del tejido vegetal fresco y se trituraron en mortero con nitrógeno líquido, se realizaron dos extracciones con etanol al 80% y una extracción con etanol al 50%, los tres extractos fueron colectados en un tubo de reacción, en cada una de las tres extracciones las muestras se incubaron durante 20 min a 80 °C. Para la cuantificación de clorofila, se tomaron 325 µL del extracto final más 850 µL de etanol al 98%, la cuantificación de clorofila fue en base a peso de biomasa fresca (PBF), la absorbancia fue registrada a 645 y 665 nm. La concentración de aminoácidos libres totales fue

determinada por el método de ninhidrina (Moore y Stein, 1954), se tomaron 80 µL del extracto y se añadió 170 µL de etanol al 70% para tener un extracto final de 250 µL, posteriormente se añadió 250 µL de la solución amortiguadora citrato sódico (pH 5.2) [Citric Acid Anhydrous (Fisher Scientific; Pittsburgh, PA, USA) (0.1 M) + Sodium Citrate Dihydrate (Fisher Scientific) (0.1 M)] y 500 µL de Ninhydrin (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) (1% en etanol al 70%). Seguido de incubación en baño de agua a 95°C por 20 min. Para la curva estándar se usó leucina (leucine; Sigma-Aldrich) (10 mM en 70% de etanol), y la concentración de aminoácidos se calculó a una absorbancia de 570 nm espectrofotómetro (Jenway, 67 UV/VIS; Vernon Hills; IL, USA).

#### **6.2.5.3. Cuantificación de azúcares solubles totales y sólidos solubles totales**

La cuantificación de azúcares solubles totales se realizó en frutos frescos de chile chilhuacle a los 90 (ddt) de acuerdo al protocolo descrito por Southgate (1969). Se utilizó 50 mg de tejido previamente liofilizado y triturado. La extracción se realizó con 50 mL de etanol al 80% a ebullición constante con un agitador magnético y placa térmica a 125°C. El sobrenadante se filtró en un volumen total de 20 mL usando etanol al 80%. Se tomó un mL del extracto final, y se colocó en tubos de ensayo de 50 mL y se añadió 6 mL de Antrona (Sigma-Aldrich) al 0.4% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Las muestras se mantuvieron en hielo, seguido de incubación en baño de agua a 95°C durante 15 min. Para la cuantificación de azúcares solubles, se realizó una curva estándar con Sacarosa (Sigma-Aldrich) (0.015% p/v) y se aforó en 100 mL de agua destilada, las mediciones fueron con absorbancia de 600 nm. Para determinación sólidos solubles totales (SST) se midió con un refractómetro digital, modelo Atago PR-100 (Tokyo, Japan), colocando tres gotas del jugo de los frutos directamente sobre la celda de lectura.

#### **6.2.5.4. Concentración de micronutrientos en tallo, ramas, hojas y frutos**

Se determinó la concentración de micronutrientos Fe, Cu y Zn, las plantas fueron divididas en tallos, ramas, hojas y frutos, las muestras secas fueron molidas, pesadas y sometidas a digestión ácida usando una mezcla de ácido perclórico y

nítrico de acuerdo al protocolo descrito por [Alcántar y Sandoval \(1999\)](#). Los extractos de los digestados una vez filtrados se leyeron en un equipo de espectrofotometría de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES Agilent, Model 725-OES; Mulgrave, Australia).

#### **6.2.5.5. Tratamiento y diseño experimental en la generación M<sub>1</sub>**

La combinación de los niveles de RG 0, 10, 80 y 120 Gy, y los niveles de potencial osmótico – 0.036, – 0.072, – 0.092 y – 0.108 MPa originó 16 tratamientos, y se organizaron en un diseño factorial con 8 repeticiones. El diseño experimental fue completamente al azar y la unidad experimental consistió en una bolsa de color negro de polietileno con capacidad de 10 L que contenía una planta del pimiento, *C. annuum*.

#### **6.2.6. Generación M<sub>2</sub>**

De la generación M<sub>1</sub> provenientes de las semillas expuestas a diferentes dosis de RG se identificaron individuos que mostraran diferentes fenotipos en cuanto a arquitectura desarrollo y color de fruto, respecto a las plantas testigo no irradiadas. Plantas que produjeron frutos de color negro, obtenidas de la primera generación de semillas irradiadas con 10, 80 y 120 Gy, se identificó como: M10, M80 y M120; estas plantas presentaron las siguientes características. Las plantas M10 fueron de porte bajo, número de bifurcación escasa, pero con mayor longitud de frutos. Las plantas M80 fueron plantas de porte bajo, mayor amarre de frutos, pedúnculo de frutos no erectos, y poca floración. Las plantas con M120 presentaron mayor altura de plantas respecto a los demás tratamientos, mayor número de flores, sin embargo, los frutos no se desarrollaron, mayor número de ramificación lo que dio lugar a plantas con mayor número de hojas. De las semillas irradiadas con 10 y 120 Gy, también se identificaron dos plantas con fenotipos distintos a los testigos sin irradiar, que produjeron frutos de color rojo y se identificaron como: M10R y M120 R. Como testigos se utilizaron plantas provenientes de semillas sin irradiar, que produjeron frutos de color negro, identificadas como WB, y frutos, WR, ambas provenientes de su centro de origen en la Región Cañada del estado de Oaxaca.

De los frutos irradiados y sin irradiar (testigos) se les extrajeron las semillas. Las semillas fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente por tres días. Una vez limpias y deshidratadas, las semillas fueron sembradas en charolas de polietileno con 180 cavidades utilizando turba como sustrato. De acuerdo a la descripción anterior, las plantas provenientes de las siembras de estas semillas fueron identificadas de la siguiente manera: WB, M10, M80, M120, WR, M10R y M120R.

#### **6.2.6.1. Extracción de ADN**

El ADN genómico se aisló de hoja de plántulas de la generación M<sub>2</sub> (WB, M10, M80, M120, WR, M10R y M120R) de chile chilhuacle con el método de CTAB descrito por [Murray y Thompson \(1980\)](#). La cuantificación de ADN total se midió por espectrofotometría, usando el NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU), la calidad de ADN fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa 1% (p/v).

#### **6.2.6.2. Amplificación de RAPD**

Fueron seleccionados y evaluados los siguientes seis primers sintetizados, tres de la secuencia aleatoria de la serie C y tres de la serie D: (OPC-02, POC-04 y POC-05; POD-04, POD-18 y POD-20) (Carl Roth GMBH, Co. Karlsruhe, Germany). La mezcla de reacciones para PCR consistió en 25 µL que contenían: 50 ng de ADN molde, 500 µM de dNTPs, 1X Taq buffer, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de primers, 1.5 U de DNA Taq-polimerasa (Promega; Madison, WI, USA). La PCR se realizó en un termociclador (MaxyGene Thermel Cycler, Applied Biosystem, Foster City, CA USA) la condición consistió: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos [94 °C, 0.5 min; 40 °C, 0.5 min, 72 °C 1.5 min] y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 2.5 min ([Valadez-Moctezuma et al., 2015](#)).

#### **6.2.6.3. Separación de productos amplificados**

Los productos de PCR se separaron en gel de poliacrilamida (29:1) al 8% en base al protocolo descrito por [Samah et al. \(2016\)](#). Para estimar el peso molecular de las bandas amplificadas se utilizaron marcadores Fermentadas de escala de

ADN de 1 kb (Thermo Fisher; Waltham, MA, USA) y escala de ADN de 100 pb (Promega, EUA). Se usó un sistema de electroforesis vertical Dual MGV-216-33 (CBS Scientific, Del Mar, CA, USA). La corrida se hizo 220 V durante 1.5 h en buffer TBE 1X (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0). Para teñir los fragmentos de ADN se usó nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) al 0.2%. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Panasonic DMC-ZS5 (Kadoma, Japón).

#### **6.2.6.4. Análisis molecular en la generación M<sub>2</sub>**

Se utilizaron bandas de ADN consistentes y reproducibles, generadas en cada primers de RAPD y fueron registrados como datos cualitativos donde “1” corresponde a la presencia de banda y “0” ausencia de bandas, con los datos se realizó una matriz binaria. Para diferenciar la capacidad de los primers más informativos entre los tratamientos se evaluó el contenido de información polimórfico (PIC), el índice marcador (MI) y el poder de resolución (Rp). Mediante la fórmula descrita por [Roldán-Ruíz et al. \(2000\)](#) se calculó la  $PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$ ; donde  $PIC_i$  es el contenido de información polimórfica del primer  $i$ ,  $f_i$  es la frecuencia de bandas presentes, y  $(1 - f_i)$  es la frecuencia de bandas ausentes. De acuerdo con [De Riek et al. \(2001\)](#) el máximo valor del marcador dominante para PIC es 0.5. El MI fue calculado como:  $MI = PIC \times \text{bandas polimórficas}$ . El Rp fue calculado según [Gilbert et al. \(1999\)](#),  $Rp = \sum I_b$  donde  $I_b$  representa la banda de información y fue calculado con la fórmula:  $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ , donde  $p$  es la proporción de los tratamientos que contienen la banda  $I$ , así como el porcentaje de bandas polimórficas (PBP).

La matriz de similitud genética entre los tratamientos fue calculado basado en el coeficiente de Jaccard's y procesados por el software FreeTree (Versión 0.9.1.5). El análisis de agrupamiento se realizó con el método de la media aritmética del grupo de pares no ponderado (UPGMA) utilizando el subprograma SAHN NTSYSpc de [Rohlf \(2000\)](#) con 500 bootstraps. Con el uso del software GenAIEx 6.501 de [Peakall y Smouse \(2012\)](#), se realizó el análisis de coordenadas principales (PCoA) basados en la matriz de similitud genética, con el fin de visualizar las distancias genética entre los mutantes de chile chilhuacle generados por RG.

### 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.3.1. Generación M<sub>1</sub>:

##### 6.3.1.1. Parámetros de rendimiento

Los factores independientes de estudio dosis de RG y potencial osmótico de la solución nutritiva se presentan en el (Cuadro 1). Con la dosis de 10 Gy se alcanzaron los valores más altos en el NTF, PBFF, PBSF, AFR y LF en chile chilhuacle, con incrementos de 23.4, 25.3, 20.9, 13.1 y 21.1% respecto a las semillas sin irradiar (Cuadro 1). El PO de la solución nutritiva de -0.072 y -0.092 MPa tuvo influencias significativas en el NTF, PBFF y PBSF respectivamente. Sin embargo, el PO de -0.092 MPa presentó efectos significativos ( $p \leq 0.05$ ) en AFR y LF con incrementos de 28.672 y 36.525% (Cuadro 1). Los resultados por efecto de la interacción dosis de RG y PO, con una dosis de 10 Gy y los cuatro PO's de la solución nutritiva afectaron de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el NTF, PBFF, PBSF, AFR y LF respectivamente (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Efecto individual de los factores RG y PO en las variables número total de frutos, peso de biomasa fresca de frutos, peso de biomasa seca de frutos, ancho de frutos y longitud del fruto.

<b>GR (Gy)</b>	<b>Número total de frutos</b>	<b>Peso de biomasa fresca de frutos (g)</b>	<b>Peso de biomasa seca de frutos (g)</b>	<b>Ancho de frutos (mm)</b>	<b>Longitud de frutos (mm)</b>
<b>0</b>	49.469 b	473.84 b	131.951 b	42.384 c	54.742 c
<b>10</b>	64.625 a	643.24 a	166.970 a	48.783 a	69.410 a
<b>80</b>	52.125 b	455.60 b	116.603 b	45.691 b	59.214 bc
<b>12</b>	52.875 b	451.46 b	111.535 b	47.385 ab	62.414 b
<b>PO (MPa)</b>	<b>Número total del frutos</b>	<b>Peso de biomasa fresca de frutos (g)</b>	<b>Peso de biomasa seca de frutos (g)</b>	<b>Ancho de frutos (mm)</b>	<b>Longitud de frutos (mm)</b>
<b>- 0.036</b>	45.875 b	382.70 b	113.834 b	39.577 c	49.586 c
<b>- 0.072</b>	62.563 a	561.43 a	137.684 a	47.099 b	61.205 b
<b>- 0.092</b>	56.688 a	564.77 a	147.676 a	55.486 a	78.119 a
<b>- 0.108</b>	53.969 ab	515.23 a	127.865 ab	42.082 c	56.869 b

<b>C.V.</b>	23.30	25.59	24.19	9.97	12.26
<b>DMS</b>	9.41	84.64	20.83	3.00	4.92

GR: radiación gamma; OP: potencial osmótico. Valores con letras distintas en columnas, son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). C.V. = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia Mínima Significativa.

**Cuadro 2.** Efecto de la interacción RG y potencial osmótico de la solución nutritiva sobre el número total de frutos, peso de biomasa fresca, peso de biomasa seca, ancho y longitud de frutos de chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	PO (MPa)	NTF	PBFF (g)	PBSF (g)	AFR (mm)	LF (mm)
0	- 0.036	42.50±17.21 cd	365.75±201.54 ef	132.68±66.75 bcd	38.97±6.41 f	47.04±16.76 e
0	- 0.072	63.12±24.46 abc	457.51±317.45 def	137.57±44.01 bcd	39.92±6.43 f	53.19±13.39 de
0	- 0.092	47.62±16.38 cd	608.37±257.21 abcd	137.29±29.37 bcd	50.98±10.04 bcd	62.88±21.70 cd
0	- 0.108	44.62±14.54 cd	463.71±147.17 def	120.25±26.92 cd	39.64±5.33 f	55.88±9.29 de
10	- 0.036	37.37±17.59 d	385.78±203.29 def	110.22±33.95 d	42.03±6.97 ef	54.24±11.29 de
10	- 0.072	87.12±23.57 a	695.29±98.89 abc	207.30±74.20 a	44.86±11.68 def	64.61±20.38 cd
10	- 0.092	73.50±23.57 ab	728.27±211.87 ab	176.76±53.57 ab	59.68±7.24 a	94.30±8.07 a
10	- 0.108	60.50±19.55 bcd	763.58±171.81 a	173.58±48.56 abc	48.54±5.69 cde	64.47±12.61 cd
80	- 0.036	47.25±10.68 cd	354.26±132.13 ef	108.67±25.64 d	39.09±10.11 f	44.04±13.69 e
80	- 0.072	46.50±8.97 cd	514.15±122.37 bcdef	96.08±32.69 d	50.36±12.54 cd	65.65±17.31 cd
80	- 0.092	50.75±21.21 bcd	470.88±209.72 cdef	133.92±43.31 bcd	52.51±14.77 abcd	72.70±23.66 bc
80	- 0.108	64.00±17.14 abc	483.09±196.53 cdef	127.73±44.28 bcd	40.79±5.25 ef	54.45±7.52 de
120	- 0.036	56.37±21.51 bcd	424.99±112.74 def	103.76±26.07 d	38.20±6.49 f	53.00±14.37 de
120	- 0.072	53.50±6.82 bcd	578.76±82.03 abcde	109.77±36.56 d	53.24±4.62 abc	61.36±18.09 cd
120	- 0.092	54.87±20.05 bcd	451.53±123.30 def	142.71±40.16 bcd	58.75±13.04 ab	82.57±15.19 ab
120	- 0.108	46.75±24.37 cd	350.53±173.01f	89.88±26.73 d	39.33±2.55 f	52.71±6.80 de

Valores con letras distintas en la misma columna, son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\leq 0.05$ ). NTF= número de frutos total, PBFF= peso de biomasa fresca en frutos, PBSF= peso de biomasa seca de frutos, AFR= ancho de frutos, LF= longitud de frutos.



Las características particulares de los frutos de chile chilhuacle generados en la M<sub>1</sub> a partir de diferentes dosis de RG y PO de la solución nutritiva se observan en la (Figura 1), se puede observar cambios en la forma de frutos, cambios en la forma de pedúnculo y los frutos rojos de los mutantes. La (Figura 1A) corresponde a los frutos silvestres negros (WB) sometidos a cuatro PO de la solución nutritiva. En la (Figura 1B) se muestran las características de los fruto sometidos a 10 Gy (M10), en la (Figura 1C) con 80 Gy (M80), en la (Figura 1D) con 120 Gy (M120), en la (Figura 1E) se presentan dos mutantes con frutos de color rojo generados con 10 Gy (M10R) y 120 Gy (M120R) con su respectivo control silvestre rojo (WR).



**Figura 1.** Frutos de la generación M<sub>1</sub>, a partir de semillas irradiadas con el isótopo Co<sup>60</sup> y sometidas a cuatro potenciales osmóticos de la solución nutritiva (– 0,036 MPa, – 0,072 MPa, – 0,092 MPa y – 0,108 MPa). (A) Frutos de chile silvestre de color negro (WB); (B) Características de los frutos sometidos con 10 Gy (M10); (C) Características de los frutos sometidos con 80 Gy (M80); (D) Características de los frutos sometidos con 120 Gy (M120) y (E) frutos rojos silvestres (WR) y mutantes con frutos rojos generados a partir de tratamientos con 10 Gy (M10) y 120 Gy (M120) y con potenciales osmóticos de – 0,036 MPa.

Nuestro estudio destaca la importancia de la inducción de mutaciones del chile chilhuacle por medio de radiación ionizante, además proporciona nuevos conocimiento sobre los cambios *in planta* que incluye cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. En todo el mundo se ha utilizado nuevas variedades derivadas de la mutagenesis inducida, por ejemplo: el arroz en Vietnam, Tailandia, China y los Estados Unidos; trigo duro en Italia y en Bulgaria; cebada en Perú y naciones Europeas; soja en Vietnam y China; así como leguminosas en Pakistán e India ([Oladosu et al., 2016](#)). Se espera que la población mundial alcance los nueve mil millones de habitantes en 2050, por tanto, el mejoramiento de cultivos debe ser una necesidad importante para satisfacer la demanda de alimentos de la creciente población ([Çelik y Atak, 2017](#)).

En la siguiente investigación, los parámetros de rendimiento: NTF, PBFF, PBSF, AFR y LF mostraron cambios importantes en los caracteres antes mencionados por efecto de la dosis 10 Gy en la generación M<sub>1</sub>, en comparación con el tratamiento sin irradiar (Cuadro 1). Estudios realizados por [Falusi et al. \(2012\)](#) mostraron que diferentes períodos de exposición a la radiación de semillas, tienden a favorecer diferentes parámetros de rendimiento en *C. annuum* (mayor número de frutos por planta, número de semillas por frutos, ancho, longitud y peso de frutos), mientras que en *C. frutescens* se presentó una reducción en longitud y peso, pero con mayor número de frutos por planta. Al mutagenizar semillas de *C. annuum*, en la generación M<sub>1</sub>, sólo observaron mutación fenotípica es decir: cambios en la forma de hoja y hábito de crecimiento ([Arisha et al., 2015](#)). Al inducir mutaciones en *C. annuum* aislaron varios mutantes únicos e interesantes en la generación M<sub>3</sub>, los

caracteres más distintivos fueron envejecimiento tardío, plantas con porte bajo, disposición de hojas, forma de hojas, ramificación y simetría de la flor (Jabeen y Mirza, 2002; Jabeen y Mirza, 2004). Los cambios más sobresalientes en los caracteres fenotípicos en la inducción de mutaciones en *C. annuum* es a partir de la M<sub>2</sub> (Paran *et al.*, 2007). Estudios recientes sugieren que la irradiación por medio del haz de carbono induce mayor eficiencia de mutaciones en pimientos en la M<sub>2</sub> (Jo *et al.*, 2016). El incremento en los parámetros de rendimiento en chile chilhuacle con dosis de 10 Gy, puede estar relacionado por un efecto hormético, en el que pequeñas dosis de radiación tienen la capacidad de estimular el crecimiento de plantas y microorganismos, por ejemplo: en *Scilla indica* la división celular y la tasa de crecimiento fue acelerado con dosis de 2.5 y 5 Gy (Chakravarty y Sen, 2001). En explantes de *Solanum tuberosum* L. en cultivo *in vitro* tratados con 2.5 Gy observaron incrementos del 38% más de microtubérculos respecto al tratamiento control (Al-Safadi *et al.*, 2000). La radiación puede tener varios efectos, tanto positivos como negativos sobre el material genético, por tanto, los fitomejoradores deberán centrarse en el uso efectivo de la RG en los programas de mejoramiento (Çelik y Atak, 2017). Nosotros obtuvimos dos plantas mutantes de frutos con pericarpio de color rojo, y (M10R y M120R) en la generación M<sub>1</sub> (Figura 1). Resultados parecidos fueron observados al irradiar semillas de pimiento dulce en la M<sub>1</sub> donde se obtuvieron dos plantas de porte bajo y una planta de frutos con pericarpio de color amarillo (Honda *et al.*, 2006). En *V. unguiculata* se han generado extensas selecciones de mutantes fenotípicos a partir de radiación en la M<sub>2</sub> y M<sub>5</sub>, que pueden ser utilizadas para pruebas de adaptabilidad y estabilidad en campo (Horn *et al.*, 2016).

Si bien, las diferencias más significativas por efecto del PO fueron observadas solamente en las variables ancho y longitud de frutos con un PO de – 0.092 MPa (Cuadro 1). En la interacción de los factores, la dosis de 10 Gy influyó en todas las variables de rendimiento, los cuatro PO de la solución nutritiva influyeron de manera dependiente en las diferentes variables de rendimiento: por ejemplo; con la combinación de 10 Gy y – 0.092 MPa dio lugar a una mayor longitud de fruto (LF) 94.30 mm (Cuadro 2) en contraste con la LF en los resultados del

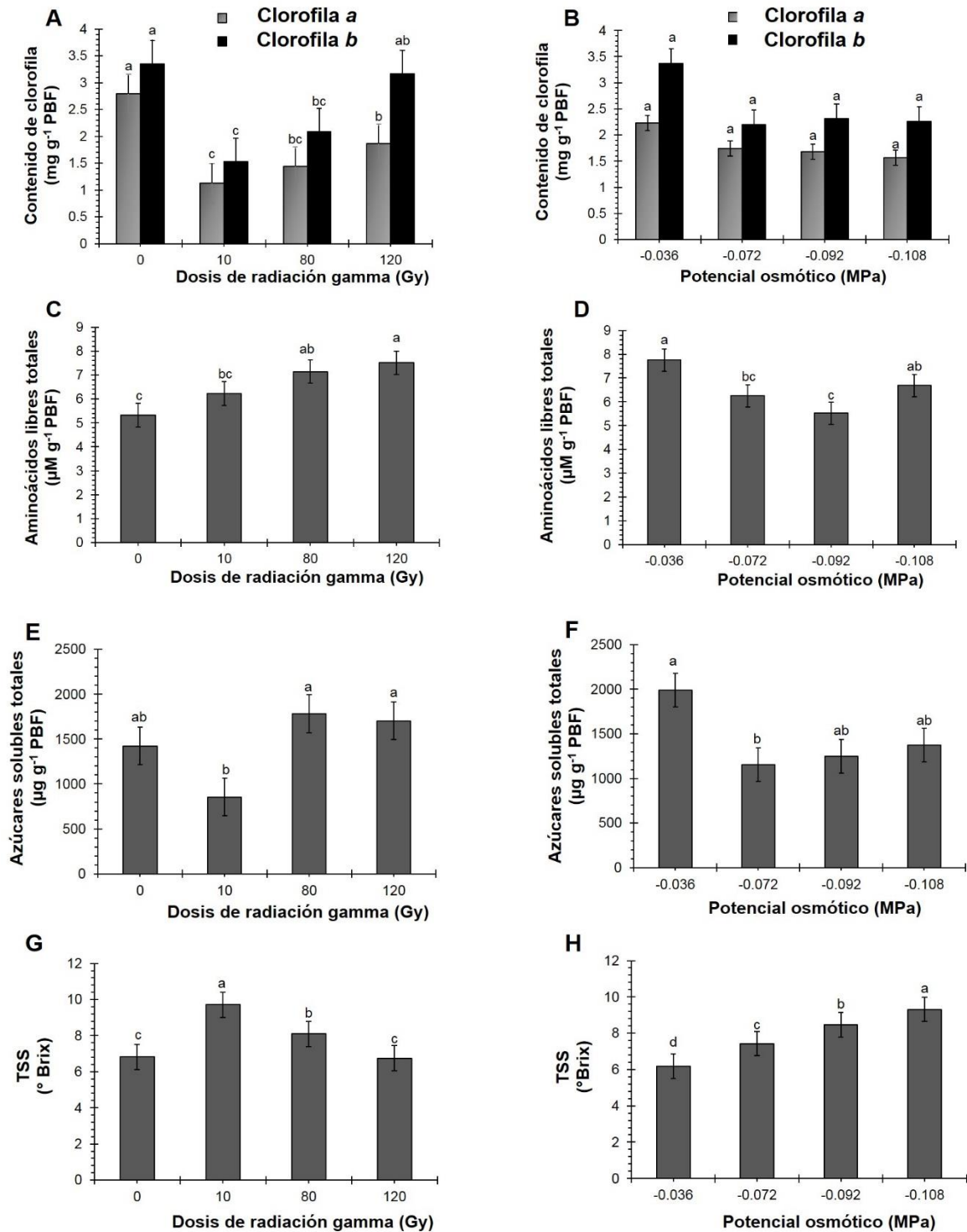
(Cuadro 1). Si bien, algunos cultivos pueden crecer con altos niveles de conductividad eléctrica, sin embargo, en la mayoría de los sistemas hidropónicos oscilan entre 1.5 y 2.5 dS m<sup>-1</sup> (Trejo-Téllez y Gómez-Merino, 2012). Incrementos en la conductividad eléctrica se asocian con una reducción en la absorción de agua, contenido de agua en las hojas y una reducción en la capacidad fotosintética en pimientos (Tadesse *et al.*, 1999); además, de una reducción en el tamaño de frutos de pimiento (Navarro *et al.*, 2010). De acuerdo con Qi *et al.*, (2014), la RG a dosis baja provocan cambios genéticos que producen mutantes mejor adaptados al estrés salino, así como la estimulación en la transducción de señales de estrés. Lo que sugieren un control multigénico con participación activa y regulación favorable en las relaciones hídricas, expresión de enzimas antioxidantes y acumulación de osmolitos por efecto de la radiación gamma (Kumar *et al.*, 2016).

#### **6.3.1.2. Clorofilas a y b y aminoácidos libres totales**

Las concentraciones de clorofilas (*a* y *b*) fue mayor en las plantas testigo (no irradiadas) y se redujeron con la dosis de RG probada (10 Gy), pero fueron aumentando a medida que se incrementó la dosis de RG hasta alcanzar un valor semejante al testigo en plantas de semillas irradiadas con la dosis más altas de RG (120 Gy), sobre todo en cuanto a *b* (Figura 2A). A medida que el PO de la solución nutritiva es más negativa, se presenta una reducción en el contenido de clorofilas, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2B). La interacción GR x PO mostró los valores más altos de clorofilas *a* y *b* en plantas de semillas no irradiadas crecidas en soluciones nutritivas con - 0.108 y - 0.092 MPa (3.1 y 4.1 mg g<sup>-1</sup> PBF, respectivamente) (Cuadro 3). Estudios ha demostrado que existe una disminución de los pigmentos fotosintéticos y biomasa debido a la RG (Agrawal *et al.*, 2007). En mutantes de cebada se observo que la concentración de clorofila y carotenoides fueron deficientes en plantas jóvenes, pero fueron normales con la edad de las plantas por RG (Maclachlan y Zalik, 1963). Sin embargo, estudios realizados por Kim *et al.* (2004) revelaron que al irradiar semillas de pimiento a dosis (2, 4, 8 y 16 Gy) existe alteración en la composición de clorofila y carotenoides; empero, la respuesta es diferente cuando los pimientos son

irradiados en plántulas, pues los cloroplastos son poco sensibles a la radiación a dosis bajas, mientras la concentración de carotenoides disminuyen de manera dependiente a la dosis de radiación (Kim *et al.*, 2005). En *Arabidopsis thaliana* al ser sometidos a una dosis relativamente alta de irradiación (50 Gy), las estructuras de los cloroplastos fueron afectados notablemente (Wi *et al.*, 2005).

La concentración de aminoácidos libres en hoja fue dependiente de la dosis de RG, y tratamiento con 120 Gy incrementó de manera significativa la concentración de aminoácidos en un 29% respecto al tratamiento sin irradiar (Figura 2C), mientras que con el PO de  $-0.036$  MPa se observó el mayor valor en la concentración de aminoácidos libres, respecto a los PO más negativos (Figura 2D). La interacción RG x PO incrementó las concentraciones de aminoácidos en hojas en plantas provenientes de semillas expuestas a 80 Gy crecidas a un PO de  $-0.036$  MPa incrementaron de manera significativa la concentración de aminoácidos libres en hojas ( $9.3 \mu\text{M g}^{-1}\text{PBF}$ ), esto explica que una menor concentración de sales en la solución nutritiva induce cambios importantes en la concentración de aminoácidos (Cuadro 3).



**Figura 2.** Efecto de los RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de clorofilas, aminoácidos, azúcares y sólidos solubles totales de frutos de chile chilhuacle. (Fig. 2A y B) Contenido de clorofila a y b. (Fig. 2C y D) Contenido de aminoácidos libres totales. (Fig. 2E y F) Azúcares



solubles totales (Fig. 2G y H) Sólidos solubles totales. Diferentes letras arriba de la columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $P \leq 0,05$ ). PBF = peso de biomasa fresca.

La radiación gamma incrementan el contenido de aminoácidos específicos como leucina, alanina, ácido glutámico; sin embargo, también se observa un decremento en la concentración de histidina en *Camellia sinensis* (Kausar *et al.*, 2013). Se há observado que la concentración de aminoácidos en plantas mutantes de cebada, particularmente serina fueron extremadamente altas (Maclachlan y Zalik, 1963). La concentración de aminoácidos sirve como un indicador para determinar los efectos de los rayos gamma en plantas, además en el proceso de señalización y en respuesta al estrés biótico o abiótico (Ali *et al.*, 2015; Hildebrandt *et al.*, 2015). Nuestro resultado demuestra que la concentración de aminoácidos libres totales en hoja de chile chilhuacle se incrementó en forma dependiente por efecto de la irradiación; los PO más negativos de la solución nutritiva como factor independiente no tuvieron ningún efecto en la concentración de aminoácidos (Figura 2C y 2D). Resultados parecidos se observó en el análisis estadístico en la interacción de los factores de estudio (Cuadro 3). La salinidad en la solución nutritiva en *C. annuum* se há observado incrementos en la concentración de aminoácidos en hojas (Piñero *et al.*, 2016). Estudios recientes sugieren que los aminoácidos mantienen el equilibrio hídrico, la osmoprotección y el flujo de iones como el K (Miranda *et al.*, 2016). El incremento de aminoácidos en plantas puede estar relacionado con la producción de aminoácidos o descomposición de proteínas inducidas por el estrés (Krasensky *et al.*, 2012). Además indican daño celular en algunas especies de plantas (Widodo *et al.*, 2009).

### **6.3.1.3. Cuantificación de azúcares solubles totales y sólidos solubles totales**

La concentración de azúcares solubles totales en frutos del chile chilhuacle, fue dependiente al incremento de dosis de RG; con 80 y 120 Gy los valores de azúcares fueron de 20.23 y 20.25% más altos que los observados en plantas provenientes de semillas sin irradiar (Figura 2E). Por otra parte, la solución nutritiva con un PO de  $-0.036$  MPa produjo los valores más altos en esta variables (1988.5



$\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Figura 2F). Respecto a la interacción RG X OP, fue la combinación de 80 Gy y  $-0.108$  MPa donde se observaron los valores más altos en cuanto a concentración de azúcares en frutos ( $2366.9 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente) (Cuadro 3). En cuanto a los SST, el tratamiento de 10 Gy incrementó en un 30% esta variable respecto al tratamiento sin irradiar (Figura 2G). Por efecto del OP, los valores más altos de los SST se observaron en los tratamientos con una mayor concentración de sales ( $-0.108$  MPa) en la solución nutritiva (Figura 2F). En tanto que la interacción GR x OP, la combinación de 10 Gy y  $-0.092$  MPa incrementó significativamente los SST en los frutos respecto a las plantas de semillas sin irradiar (Cuadro 3).

Se ha observado incrementos importantes en la concentración de azúcares, por efecto de la RG en plantas como *Glycine max*, *Cullen corylifolium*, *Brachypodium distachyon* (Moussa, 2011; Jan et al., 2013; Kim et al., 2015). Si bien, es cierto que la concentración de azúcares puede variar con el tipo de planta y factor de estrés, por ejemplo; estudios sugieren que la salinidad y sequía incrementan la concentración de azúcares, en tanto que la irradiación disminuyen su concentración (Rosa et al., 2009). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la concentración de azúcares en los frutos de chile chilhuacle fue estimulada por el incremento de la dosis de RG; mientras que por efecto del PO de la solución nutritiva la tendencia fue fueron inversa (Figura 2E y 2F). El PO durante la interacción de los factores la concentración de aminoácidos fueron mayores y significativos con  $-0.092$  MPa (Cuadro 3). Los azúcares que se acumulan en respuesta a un factor de estrés, tienen la capacidad de proteger las membranas y proteínas (Kaplan y Guy, 2004). Las funciones de los azúcares actúan como carbohidratos transportados en las plantas vasculares y como moléculas que regulan la expresión génica (Baier et al., 2004), son necesarios para satisfacer las demandas de carbono y energía del sistema (Tuteja y Sopory, 2008).

La mayoría de estudios se centran en evaluar el efecto de la RG en postcosecha y han observado, por ejemplo, que en *Citrus sinensis* L. la irradiación disminuyó el contenido de sólidos solubles y pérdida de peso, entre otros atributos que lo hacían no comerciales (McDonald et al., 2013). La irradiación en frutos de

papaya con 750 Gy; provocó que el contenido de ácido ascórbico, carotenoides y sólidos solubles fuera similar a los controles, pero la maduración fuera tardía (Wall, 2015). La irradiación en peras provocó que una vez cosechadas observaron pérdida de peso y reducción de sólidos solubles (Sea *et al.*, 2015). Parece ser que los cambios en la concentración de sólidos solubles en los frutos dependen del incremento de la dosis de irradiación (Kim y Yook, 2009). En nuestro trabajo la irradiación gamma fue en semillas para posteriormente evaluar su efecto en los sólidos solubles en los frutos. Nuestros resultados demuestran que la menor dosis de RG (10 Gy) incrementó la concentración de °Brix; sin embargo, la mayor concentración de sales en la solución nutritiva indujo la mayor concentración de °Brix en los frutos (Figura 2G y 2H). La misma tendencia en los resultados fue observada en la interacción de los factores de estudio (Cuadro 3). Se ha observado en pimiento híbrido ‘Orlando’ que cuando la conductividad eléctrica estuvo por arriba de 2.0 dS m<sup>-1</sup> fueron afectados los °Brix, aminoácidos, azúcares y sobre todo el rendimiento (Navarro *et al.*, 2002). En el pimiento híbrido ‘Icaro’ observaron que los sólidos solubles y materia seca se incrementaron de manera significativa con la salinidad (4.0 dS m<sup>-1</sup>) (Giuffrida *et al.*, 2014). Lo anterior sugiere que las plantas de chile chilhuacle, con PO de -0.108 se observó una reducción en el tamaño de frutos de color negro; mientras que los frutos de color rojo hubo una reducción en el tamaño, por efecto de la radiación gamma, debido que el PO fue de apenas -0.036 MPa (Figura 1). Además pone en evidencia que existen especies dentro del género *Capsicum* tolerantes y sensibles a la salinidad.

**Cuadro 3.** Interacción de las dosis RG y PO sobre el contenido de clorofila *a* y *b*, aminoácidos libres, azúcares totales solubles y sólidos solubles totales en chile chilhuacle.

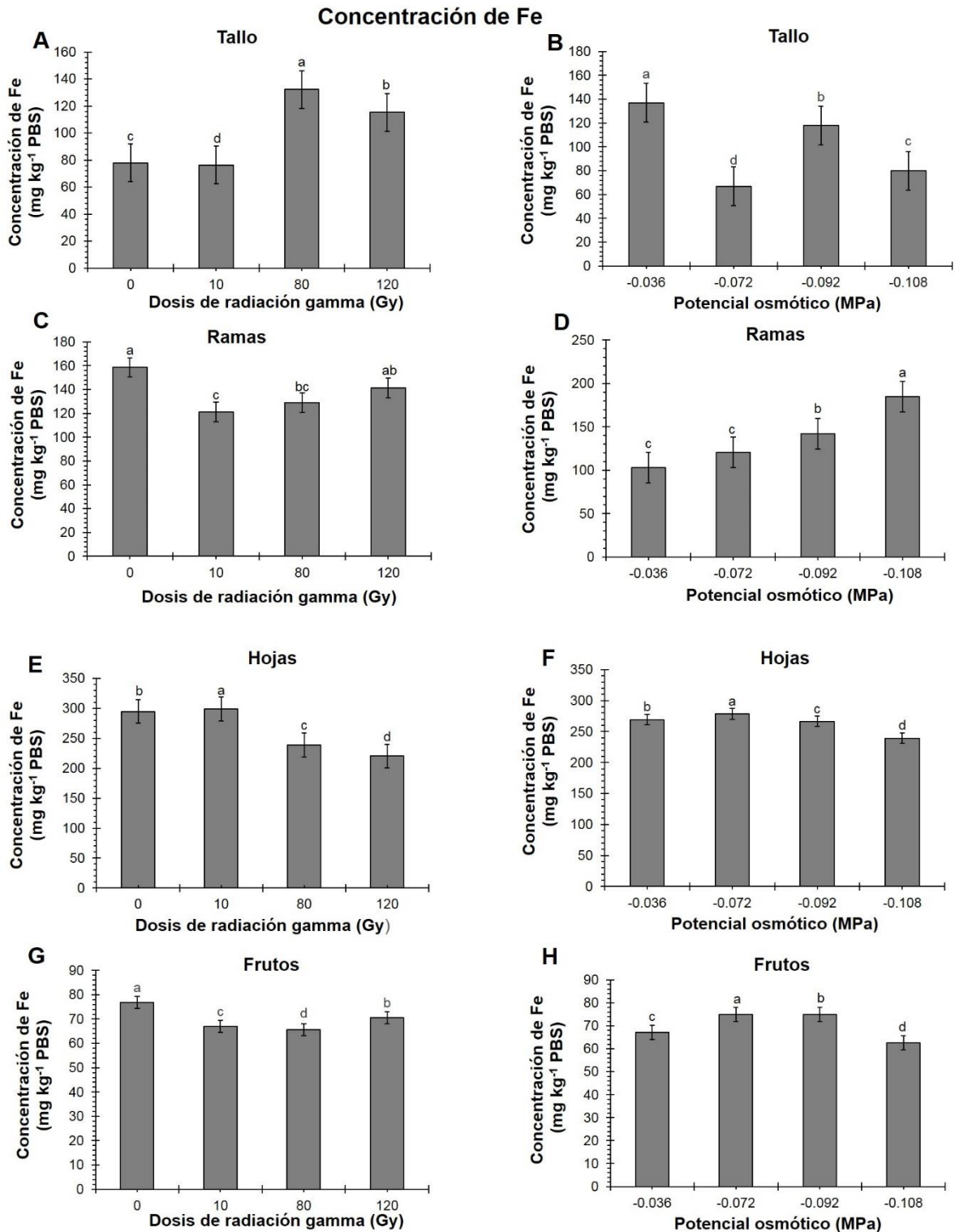
Dosis (Gy)	PO (MPa)	Contenido de clorofila <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> PBF)	Contenido de clorofila <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> PBF)	Amino ácidos libres (μM g <sup>-1</sup> PBF)	Azúcares solubles totales (μg g <sup>-1</sup> PBF)	Sólidos solubles totales (°Brix)
0	- 0.036	2.99±0.49 b	3.84±0.57 c	5.42±2.78 l	2022.40±678.75 abcd	3.94±0.18 p
0	- 0.072	2.42±0.37 b	2.45±0.49 j	5.60±1.35 j	797.82±138.19 hgi	8.00±0.00 i
0	- 0.092	2.63±1.03 c	4.17±0.85 a	4.80±0.32 n	1559.25±919.78 bcdef	8.09±0.11 h
0	- 0.108	3.11±0.76 a	2.94±1.00 g	5.46±0.33 k	1280.68±126.69 efgh	7.27±0.09 j
10	- 0.036	1.61±0.79 h	2.87±1.36 h	8.97±0.41 b	1484.11±1431.05 cdefg	9.24±0.87 e
10	- 0.072	0.81±0.07 p	1.25±0.13 m	7.12±1.40 g	806.97±83.46 ghi	9.00±0.00 f
10	- 0.092	0.92±0.47 n	0.55±0.13 p	4.09±0.15 p	487.54±122.58 i	10.40±0.22 a
10	- 0.108	1.10±0.29 m	1.44±0.09 l	4.71±0.41 o	644.11±76.21 hi	10.26±0.77 b
80	- 0.036	1.80±0.83 g	3.24±1.34 f	9.35±0.11 a	2183.54±929.12 abc	6.94±0.18 m
80	- 0.072	1.67±0.07 k	1.01±0.01 o	5.07±0.46 m	1118.97±206.43 fghi	7.01±0.03 k
80	- 0.092	1.62±0.40 i	1.24±0.18 n	6.45±0.75 i	1463.54±916.51 defg	8.37±0.58 g
80	- 0.108	1.15±0.08 l	2.83±3.15 i	7.68±1.13 d	2366.97±872.39 a	10.11±0.11 c
120	- 0.036	2.45±1.54 e	3.53±1.93 d	7.27±1.02 e	2264.11±753.63 ab	4.64±0.30 o
120	- 0.072	2.55±0.32 d	4.06±0.28 b	7.18±1.02 f	1901.82±1191.32 abcde	5.74±0.34 n
120	- 0.092	1.54±0.23 j	3.29±0.73 e	6.72±0.47 h	1450.39±437.39 defg	7.00±0.00 l
120	- 0.108	0.90±0.21 o	1.80±0.41 k	8.88±0.58 c	1198.40±352.55 efghi	9.63±0.65 d

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). PBF = peso de biomasa fresca.

#### **6.3.1.4. Concentración de micronutrientos en tallo, ramas, hojas y frutos**

La concentración de Fe en tallos de chile chilhuacle fue dependiente de la dosis de RG, con la dosis de 80 Gy el incremento fue de un 40.9% respecto al tratamiento sin irradiar (Figura 3A). Los tratamientos con los PO más negativos (-0.108 MPa) reducen la concentración de Fe en tallos a diferencia del PO de -0.036 MPa (Figura 3B). Los valores más altos de Fe observados por efecto de la interacción de la RG y el PO fueron con 80 Gy y -0.036 MPa (Cuadro 4). Los tratamientos con todas las dosis de RG (10, 80 y 120 Gy) reducen la concentración de Fe en ramas en un 23.613, 18.728 y 10.864% respecto al tratamiento control (Figura 3C). El PO de la solución nutritiva más negativa (-0.108 MPa) fue el tratamiento que más incrementó el Fe en las ramas (184.74 mg kg<sup>-1</sup>) (Figura 3D). La dosis de 10 Gy incrementó la concentración de Fe foliar (299.2 mg kg<sup>-1</sup>) en 1.470% respecto al control (Figura 3E). Los tratamientos con el PO de -0.072 MPa tuvo una respuesta favorable en la concentración de Fe en hojas observándose el mayor valor de (278.6 mg kg<sup>-1</sup>) (Figura 3F). De manera general se observa que las hojas son el órgano que presenta mayor concentración de Fe.

Hubo una reducción en la concentración de Fe en los frutos con los tratamientos sometidos a RG (10, 80 y 120 Gy) donde los valores observados fueron: 12.75, 14.45 y 8.13% respecto al tratamiento testigo (Figura 3G). Con un del PO de -0.072 MPa se obtuvo la mayor concentración de Fe (75.1 mg kg<sup>-1</sup>) en los frutos (Figura 3F). Nuestros resultados demuestran que durante la interacción de la RG y PO de la solución nutritiva, la radiación no influyó en la concentración de Fe en ramas, hojas y frutos, solamente se vio influenciado por el PO (-0.108, -0.092 y -0.072 MPa), solo en tallo, los valores más altos fueron observados con 80 Gy y -0.036 MPa (Cuadro 4).



**Figura 3.** Efecto de las dosis RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de Fe en diferentes órganos del chile chilhuacle. (Fig. 3a y b) Tallo. (Fig. 3c y d) Ramas. (Fig. 3e y f) Hojas y (Fig. 3g y h) frutos. Diferentes

letras por encima de la columna indican diferencias significativas (Tukey,  $\leq 0,05$ ). PBS = peso de biomasa seca.

**Cuadro 4.** Interacción de las dosis RG y PO sobre la concentración de Fe (mg kg<sup>-1</sup> de PBS) en el tallo, ramas, hojas y frutos del chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	PO (MPa)	Tallo	Ramas	Hojas	Frutos
0	- 0.036	89.20±4.10 h	112.34±27.16 de	298.32±44.16 d	71.39±5.94 h
0	- 0.072	105.14±10.38 e	185.78±115.20 abc	250.21±2.26 k	93.51±32.14 a
0	- 0.092	62.10±10.69 m	110.69±22.28 de	379.68±33.33 a	84.86±20.06 b
0	- 0.108	55.40±10.85 n	225.91±20.15 a	250.78±5.73 j	57.21±7.69 n
10	- 0.036	77.42±18.34 k	100.79±15.11 e	311.11±42.49 c	53.53±2.1 p
10	- 0.072	48.75±13.75 o	96.99±15.79 e	350.70±32.35 b	80.61±8.80 c
10	- 0.092	92.76±21.37 g	124.54±8.18 de	282.84±54.50 e	67.80±8.81 j
10	- 0.108	86.78±18.19 i	162.53±66.16 bcd	252.31±14.82 i	67.88±7.07 k
80	- 0.036	207.24±16.90 a	111.22±7.20 de	270.40±25.13 f	69.95±8.1 i
80	- 0.072	72.88±4.21 l	112.54±3.71 de	258.85±6.79 g	54.66±1.40 o
80	- 0.092	164.19±13.60 c	133.11±7.87 cde	213.40±20.53 m	74.92±6.65 d
80	- 0.108	84.40±12.40 j	158.98±55.59 bcd	212.79±6.53 n	63.08±4.01 m
120	- 0.036	174.26±29.41 b	86.94±19.21 e	196.96±31.27 o	73.44±2.60 e
120	- 0.072	40.83±4.58 p	86.76±16.45 e	254.51±32.28 h	71.59±9.91 g
120	- 0.092	152.69±192.23 d	200.53±149.49 ab	189.32±44.31p	72.63±2.34 f
120	- 0.108	93.54±42.33 f	191.53±11.57 ab	241.20±11.99 l	64.37±2.23 l

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). PBS = peso de biomasa seca.

La concentración de Cu en tallo se incrementó en un 10.053% cuando los tratamientos fueron irradiados con 10 Gy (Figura 4A), el PO de (- 0.108 MPa) incrementó la concentración de Cu ( $15.81 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en comparación con resto de los tratamientos (Figura 4B). La concentración de Cu en ramas se incrementó en un 12.780% cuando el tratamiento con una dosis de 10 Gy (Figura 4C). El PO de - 0.072 MPa incrementó de manera significativa la concentración de Cu en tallo, el valor mayor fue de ( $14.04 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Figura 4D). La dosis de 10 Gy incrementó de manera significativa la concentración de Cu en tejido foliar ( $25.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) respecto al tratamiento sin irradiar (Figura 4E), el PO de - 0.108 MPa incrementó de manera significativa la concentración de Cu foliar ( $25.43 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en comparación con el PO de - 0.036 MPa ( $18.62 \text{ mg kg}^{-1}$ ) respectivamente (Figura 4F). La concentración de Cu en frutos fue dependiente de la dosis de RG, los valores más altos observados fueron de 24.462% con la dosis de 10 Gy respecto a los tratamientos sin irradiar (Figura 4G), no se observaron diferencias significativas en la concentración de Cu por efecto de los tratamientos con PO (Figura 4H). Con la interacción de 10 Gy y de - 0.092 MPa hubo incrementos significativos en la concentración de Cu en tallo, ramas y frutos. Mientras que en hojas la concentración de Cu solo fue influenciada por efecto del PO de - 0.072 MPa respectivamente (Cuadro 5).

La concentración de Zn en tallos se incrementó de manera significativa en un 45.921% cuando las semillas fueron irradiadas con 10 Gy respecto al tratamiento sin irradiar (Figura 5A). En tanto que con un PO de - 0.036 MPa la concentración de Zn fue superior ( $39.83 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de manera significativa (Figura 5B). La concentración de Zn en ramas presentó un incremento de 12.409% con la dosis de radiación de 10 Gy (Figura 5C), mientras que la concentración de Zn por efecto del PO de - 0.092 MPa los valores más altos fueron  $46.89 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 5D) respectivamente. En hojas la concentración de Zn se incrementó en un 16.376% con la dosis de 120 Gy (Figura 5E). Mientras que por efecto de PO de la solución nutritiva, los valores más altos de Zn en tejido foliar fueron obtenidos en los tratamientos de - 0.072 MPa (Figura 5F). No hubo diferencias significativas en la concentración de Zn en frutos por efecto de la dosis de RG y PO de la solución nutritiva (Figura 5G and 5H).

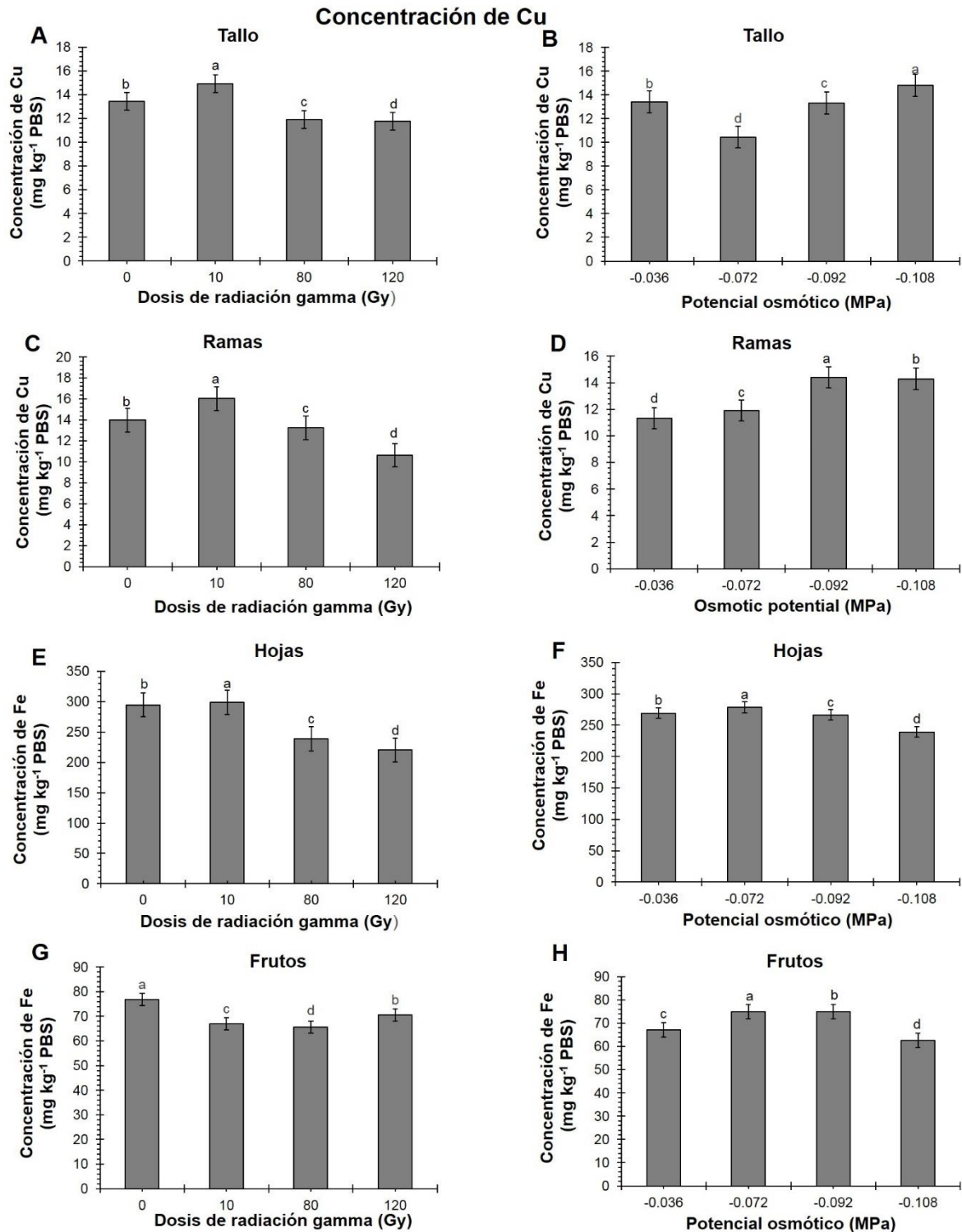


El efecto de la interacción de la dosis de radiación y PO de la solución nutritiva, afectó de manera significativa la concentración de Zn, los valores más altos observados en tallo se encontraron con la dosis de 80 Gy y – 0.092 MPa. En ramas se observaron con 120 Gy y – 0.108 MPa. En hojas con 120 Gy y – 0.072 MPa y finalmente en frutos, los mayores valores de Zn se encontraron con 120 Gy y – 0.108 MPa (Cuadro 6).

El contenido de micronutrientes es otro parámetro que debe considerarse en la inducción de mutaciones para determinar la dosis adecuada de radiación gamma. Existen evidencia que en plántulas de *G. max* L. la concentración de Fe, Cu y Zn se incrementan conforme aumenta la dosis de RG ([Alikamanoglu et al., 2011](#)).

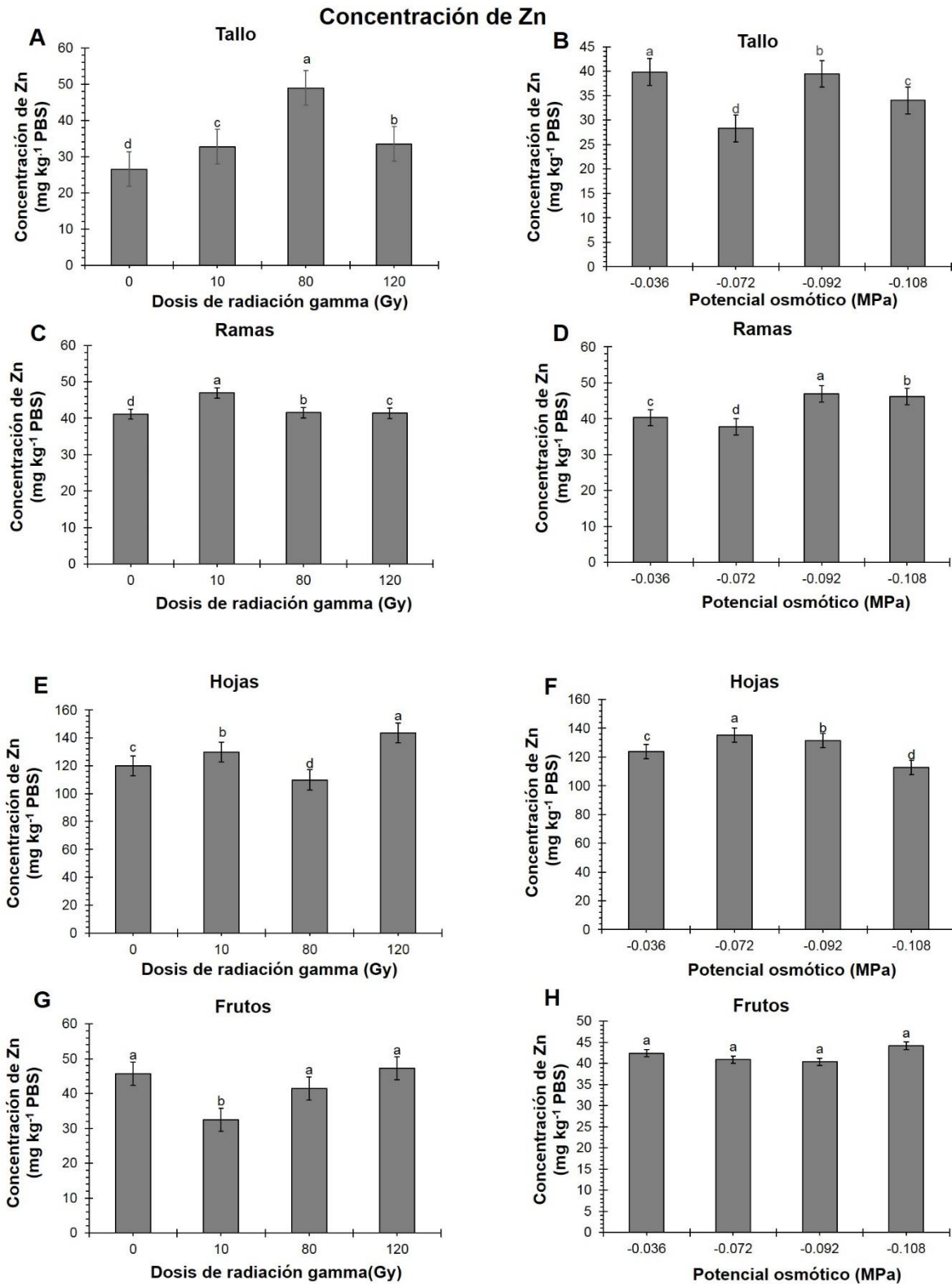
Incrementos en la concentración de Fe en los brotes de trigo fue dependiente de la dosis de RG con 25 Gy ([Singh et al., 2013](#)). En semillas comestibles de *C. arietinum* L. la acumulación de macro y micronutrientes entre ellos Fe, Cu y Zn se incrementaron de forma significativa por efecto de la irradiación. Esto pone de manifiesto la respuesta de adaptación de las plantas para mantener su homeostasis nutrimental, y que puede tener cierta correlación con la constitución genética de la planta ([Maity et al., 2010](#)). La RG en *Triticum aestivum* indujo mayor concentración de macro y micronutrientes en tallo y hojas, pero no en granos ([Singh y Datta, 2010](#)). Nuestro estudio demuestra que la concentración de Fe en tallos y hojas fue dependiente de la dosis de RG (Figura a y e), en tanto que en las ramas y frutos de chile chilhuacle el tratamiento sin ninguna RG tuvieron los valores más altos (Figura c y g). El incremento de la concentración de Fe en los diferentes órganos por efecto del PO de la solución nutritiva fue más notables en ramas, hojas y frutos (Figura 3 d, f y h). La interacción de los factores de estudio RG x PO indican, que con 80 Gy y un PO de – 0.036 MPa se incrementó de manera significativa la concentración de Fe en tallo, mientras que en ramas, hojas y frutos la concentración de Fe fue significativo sólo por efecto del PO de la solución nutritiva (– 0.108, – 0.092, – 0.072 MPa (Cuadro 4). El Fe cumple muchas funciones en la planta, pero puede ocasionar daño celular severo como consecuencia de radicales hidroxilo reactivos. La absorción de Fe, sus concentraciones dentro de tejidos particulares y su distribución

subcelular están sujetas a un control. La baja disponibilidad del Fe en la mayoría de los suelos requiere la movilización de compuesto de hierro escasamente solubles ([Schmidt, 2003](#)).



**Figura 4.** Efecto de las dosis de RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de Cu en diferentes órganos del chile. (Fig. 4a y b) Tallo. (Fig. 4c y d) Ramas. (Fig. 4e y f) Hojas y (Fig. 4g y h) frutos. Diferentes letras

por encima de la columna indican diferencias significativas (Tukey,  $\leq 0,05$ ).  
PBS = peso de biomasa seca.



**Figura 5.** Efecto de las dosis RG (Gy) y PO de la solución nutritiva (MPa) sobre la concentración de Zn en diferentes órganos del chile. (Fig. 5a y b) Tallo. (Fig. 5c y d) Ramas. (Fig. 5e y f) Hojas y (Fig. 5g y h) frutos. Diferentes letras por

encima de la columna indican diferencias significativas (Tukey,  $\leq 0,05$ ). PBS = peso de biomasa seca.

La mayor concentración de Cu en tallo, ramas, hojas y frutos fue dependiente de la dosis de RG; cambios importantes en la concentración de este micronutriente fue observado por efecto del PO en tallo, ramas y hojas (Figura 4). Con la interacción RG x PO hubo diferencias significativas en la concentración de Cu, para el caso de tallo, ramas y frutos, pues con 10 Gy y - 0.092 MPa se observaron los valores más altos. En tanto que en hojas hubo diferencias estadísticas significativas, donde la mayor concentración de Cu fue influenciado con el PO de - 0.072 MPa (Cuadro 5). En tallo, ramas y hojas la concentración de Zn fue dependiente de la dosis de GR. Existen diferencias significativas en la concentración de Zn en tallo, ramas y hojas por el PO (Figura 5). En la interacción de los factores se observan que la concentración de Zn es dependiente de la dosis de irradiación y PO en cada uno de los órganos (Cuadro 6), excepto en frutos cuando se evalúa como factor independiente (Figura 5h).

**Cuadro 5.** Interacción de las dosis RG y PO sobre la concentración de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$  PSB) en el tallo, ramas, hojas y frutos del chile chilhuacle.

<b>Dosis (Gy)</b>	<b>PO (MPa)</b>	<b>Tallo</b>	<b>Ramas</b>	<b>Hojas</b>	<b>Frutos</b>
0	- 0.036	11.08±0.84 m	9.69±1.31 m	18.49±1.06 l	7.69±0.61 c
0	- 0.072	15.03±1.03 d	17.01±0.77 b	30.02±1.82 a	10.42±1.56 abc
0	- 0.092	13.92±2.08 g	12.44±3.16 k	28.47±1.14 b	8.34±0.57 bc
0	- 0.108	13.64±2.57 h	16.82±1.02 c	21.99±1.18 j	6.95±0.44 c
10	- 0.036	16.44±9.88 c	13.35±1.22 h	24.23±0.80 h	7.36±0.24 c
10	- 0.072	11.89±3.88 k	16.15±0.41 d	28.04±1.43 d	14.63±1.90 ab
10	- 0.092	18.18±0.54 a	20.63±0.84 a	24.94±0.76 f	15.63±14.18 a
10	- 0.108	13.17±1.00 i	14.02±1.34 g	24.36±0.80 g	6.61±0.80 c
80	- 0.036	11.70±1.49 l	13.04±0.49 j	21.59±0.90 k	8.44±0.41 bc
80	- 0.072	8.79±0.91 n	13.19±0.76 i	14.17±0.50 n	6.58±0.58 c
80	- 0.092	12.75±0.54 j	15.07±1.34 e	11.98±0.19 o	6.84±0.63 c
80	- 0.108	14.39±1.50 f	11.69±0.98 l	26.95±1.66 e	7.25±1.44 c
120	- 0.036	14.40±2.97 e	9.24±0.42 o	10.17±0.86 p	9.20±1.27 abc
120	- 0.072	6.11±0.32 p	9.23±0.62 p	23.09±0.82 i	8.23±0.25 bc
120	- 0.092	8.42±2.60 o	9.44±1.37 n	15.61±0.73 m	9.88±0.64 abc
120	- 0.108	18.03±5.90 b	14.59±0.55 f	28.41±0.17 c	12.34±0.76 abc

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). PSB: peso seco de la biomasa.

**Cuadro 6.** Interacción entre la dosis de RG y el PO en la concentración de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  PSB) en el tallo, ramas, hojas y frutos del chile chilhuacle.

Dosis (Gy)	PO (MPa)	Tallo	Ramas	Hojas	Frutos
0	- 0.036	29.36±8.37 j	32.14±3.09 n	130.78±7.74 e	43.01±12.64 abc
0	- 0.072	24.20±2.89 p	39.02±5.69 k	93.08±5.93 p	53.70±16.14 ab
0	- 0.092	27.91±1.84 l	54.80±9.02 b	160.87±14.31 c	39.67±12.58 abc
0	- 0.108	24.30±5.92 o	38.60±5.10 l	95.22±6.23 o	46.37±14.38 abc
10	- 0.036	42.67±16.74 d	52.91±21.08 c	128.47±22.86 f	30.44±2.35 bc
10	- 0.072	30.50±2.67 h	44.80±2.49 f	165.97±10.37 b	28.72±6.04 c
10	- 0.092	27.98±8.14 k	45.72±3.29 d	125.19±8.79 g	36.71±7.70 abc
10	- 0.108	29.65±3.23 i	44.46±8.85 g	99.71±6.64 m	34.21±7.14 abc
80	- 0.036	42.38±17.61 e	44.05±2.29 h	124.19±9.14 h	40.70±8.52 abc
80	- 0.072	27.65±5.88 m	38.48±5.64 m	99.76±4.04 l	42.34±3.84 abc
80	- 0.092	74.25±22.13 a	41.61±3.57 j	118.10±2.46 j	42.00±16.20 abc
80	- 0.108	51.33±14.95 b	41.96±3.92 i	97.43±13.32 n	40.79±10.37 abc
120	- 0.036	44.88±9.27 c	32.04±8.13 o	112.33±4.42 k	51.45±2.03 abc
120	- 0.072	30.72±19.15 f	28.54±4.10 p	181.86±6.36 a	38.90±7.94 abc
120	- 0.092	27.49±3.08 n	45.39±6.18 e	121.42±6.41 i	43.15±11.55 abc
120	- 0.108	30.69±5.67 g	59.57±2.61 a	158.19±7.64 d	55.31±11.65 a

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). PSB = peso seco de la biomasa.



### 6.3.2. Generación M<sub>2</sub>

#### 6.3.2.1. Análisis de RAPD y relación genética

Fueron seleccionados y evaluados los siguientes seis primers sintetizados, tres de la secuencia aleatoria de la serie C y tres de la serie D: (OPC-02, POC-04 y POC-05; POD-04, POD-18 y POD-20) (Carl Roth GMBH, Co. Karlsruhe, Germany). De los seis primers solo cinco produjeron varios amplicones polimórficos. Un total de 57 bandas fueron amplificadas y 12 revelaron polimorfismos (22% del total). El número de bandas polimórficas varió de 0 (con el primer C-04) a 6 (con el primer D-20) con un promedio de 2.4 bandas polimórficas por primer (Cuadro 7). El porcentaje de bandas con polimórficas varió de 11% (con C-02) y 43% (con C-05). El tamaño de los productos de PCR considerados en el análisis osciló entre 100 y 500 pb. La estimación de los valores de Rp exhibió una tasa total de 6.87 y varió de 0 (con D-04) a 3.714 (con D-20), con promedio de 1.37 (Cuadro 7). El PIC varió de 0 (con D-04) a 0.226 (C-04) con un promedio de 0.10 y el MI varió de 0 (D-04) a 0.648 (D-20) con un promedio de 0.34. Entre los primer probados, D-20 y C-05 son los más informativos por su alto valor Rp en los mutantes de chile chilhuacle generados por radiación ionizante en la generación M<sub>2</sub> (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Características de los cebadores RAPD y perfil de huella dactilar de ADN utilizados en el análisis de mutantes de chile chilhuacle en la generación M<sub>2</sub>.

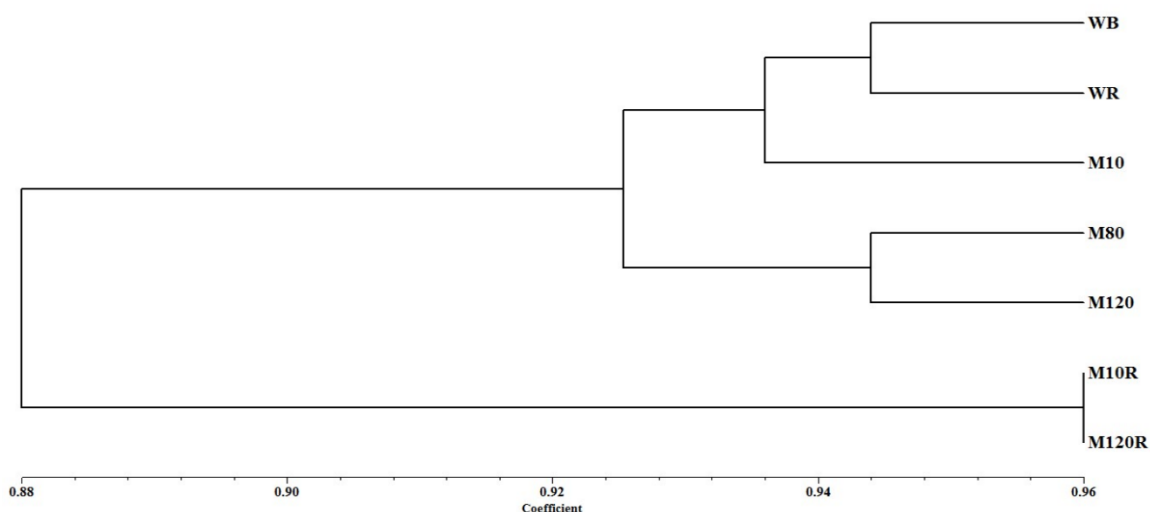
Marcados	Primer	Secuencia (5' - 3')	Bandas totales	Bandas polimórficas	PPB	Rp	PIC	MI
RAPD	D-04	TCTGGTGAGG	13	0	0	0	0	0
	D-20	ACCCGGTCAC	15	6	40	3.714	0.108	0.648
	C-02	GTGAGGCGTC	9	1	11.11	0.571	0.018	0.018
	C-04	CCGCATCTAC	13	2	15.38	0.571	0.226	0.452
	C-05	GATGACCGCC	7	3	42.85	2.000	0.192	0.576
Promedio				2.4	21.87	1.37	0.10	0.34
Total			57	12		6.85		

PPB = porcentaje de bandas polimórficas, Rp = poder de resolución, PIC = contenido de información polimórfica, MI = índice de marcador.

Basándonos en el coeficiente de similitud de Jaccard's, se encontró la máxima similitud (0.958) entre los mutantes con frutos de color rojo (i.e. M10R y M120R), (Cuadro 8), mientras que la mínima similitud (0.81) se observó entre

WB y M120R. El dendrograma obtenido del análisis UPGMA de similitud genética basado en el marcador RAPD se presenta en la (Figura 6). El dendrograma muestra la formación de dos grupos principales de mutantes. El primero comprende los controles (WB, WR), y frutos de color negro (M10, M80 y M120). El segundo grupo corresponde al de los frutos con pericarpio de color rojo (M10R y M120R). De acuerdo con dendrograma obtenido, los frutos de color rojo (M10R y M120R) fueron los tratamientos más distantes (Figura 6).

**Cuadro 8.** Matriz de similitud de Jaccard entre los mutantes de chile chilhuacle en la generación M<sub>2</sub>, generada a partir de los datos de los marcadores RAPD.

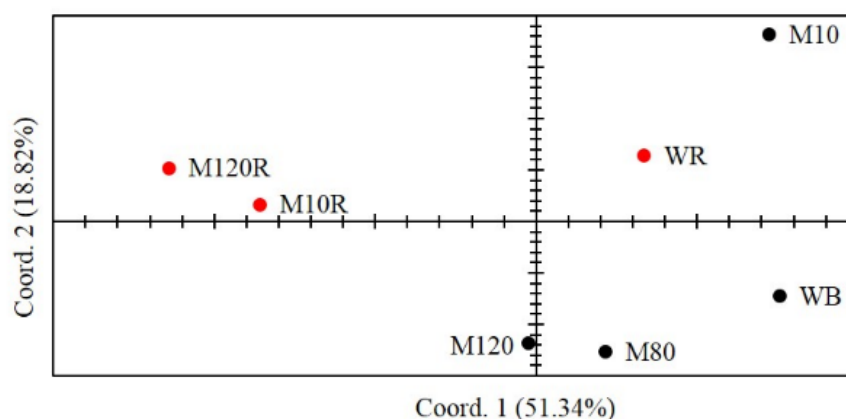


	WB	M10	M80	M120	WR	M10R	M120R
WB	0.000						
M10	0.929	0.000					
M80	0.945	0.912	0.000				
M120	0.927	0.894	0.944	0.000			
WR	0.945	0.946	0.927	0.944	0.000		
M10R	0.854	0.857	0.905	0.923	0.905	0.000	
M120R	0.818	0.821	0.867	0.884	0.867	0.958	0.000

**Figura 6.** Dendrograma basado en UPGMA de los perfiles RAPDs en la generación M<sub>2</sub> de chile chilhuacle.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) se utilizó para confirmar aún más nuestros resultados entre los mutantes de chile chilhuacle y los tratamientos sin irradiación (Figura 7). El PCoA reveló que las tres primeras coordenadas explicaron el 81.6% de la variación total. Las dos primeras coordenadas

representaron un porcentaje de la variación entre los tratamientos: 51.3 y 18.8% respectivamente. Los resultados mostraron que los mutantes con pericarpio de color rojo se encontraron más distanciados del resto de tratamientos del eje 1 (Figura 7) y principalmente del testigo. Los frutos de los mutantes de color negro se separaron del testigo (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) del conjunto de datos RAPD en la generación de chile chilhuacle M<sub>2</sub>.

Los marcadores RAPD demostraron ser una herramienta poderosa para analizar la variación entre los mutantes y los tratamientos sin irradiar en la generación M<sub>2</sub> de chile chilhuacle. La técnica RAPD analiza un mayor número de loci, y proporciona una evaluación más general del genoma con alto potencial para detectar polimorfismos. Además esta tecnología tiene bajo costo y arroja una gran cantidad de datos en un tiempo relativamente corto (Mucciarelli *et al.*, 2014). Dos primers (D-20 y C-05) fueron capaces de distinguir los mutantes de frutos de color rojo y frutos de color negro, debido al alto valor de PPB, Rp y MI (Cuadro 7). La inducción de mutaciones en *C. annuum* se ha observado que en la M<sub>2</sub> y con el uso de marcadores moleculares RAPD el porcentaje promedio de bandas polimórficas fue 47.8% y el promedio de bandas polimórficas por primers fue 4.4 (Aslam *et al.*, 2016). En otro estudio de *C. annuum* el porcentaje promedio de bandas polimórficas fue 52%, el promedio de bandas polimórficas por primers fue de 4.8 (Mullainathan *et al.*, 2014). Los marcadores RAPD también se ha utilizado de manera eficiente para identificar cultivares y prueba de pureza en *C. annuum* (Ilbi, 2003). En *Jatropha curcas* sometidas a irradiación gamma el porcentaje de polimorfismo total fue de 65%, el número de bandas por primer fue

10.66 y el PIC más alto en uno de los primer fue 0.6 (Dhillon *et al.*, 2014). En *J. curcas*, también se ha reportado un porcentaje promedio de bandas polimórficas fue de 57%, el promedio de bandas polimórficas por primers 4.5, un valor de PIC más alto en uno de los 0.4 respectivamente, el valor promedio más alto de MI fue 14.1 y de Rp 11.1 (Dhakshanamoorthy *et al.*, 2015). Por tanto, los primers con más información pueden utilizarse para estudios posteriores.

Si bien, el índice de similitud fue calculado sobre la base de cinco primers RAPD usando el coeficiente de Jaccard's (Cuadro 8), los mutantes con frutos de color rojo tuvieron más estrecha relación con el mayor índice de similitud (0.95), en tanto que el control WR y el mutante M120R fueron relacionados con un menor índice de similitud genética (0.81). Entre híbridos de *C. frutescens* se ha observado estrecha relación (0.88), pero menor similitud genética (0.70) entre híbridos de *C. frutescens* y *C. annuum* para marcadores ISSR (Ahmed, 2013). El coeficiente de similitud genética en 23 poblaciones de *C. annuum* fueron 0.42 y 0.97 basados en datos RAPD (Bahurupe *et al.*, 2013). Los valores altos en el coeficientes de similitud indican cercanía genética (Deng *et al.*, 2007). Existe una gran diversidad genética en el género *Capsicum* que puede facilitar al obtentor el desarrollo de nuevas variedades, siempre que se comprenda adecuadamente la distancia genética entre las accesiones en estudio (Bhadragoudar y Patil, 2011). La similitud genética basada en datos RAPD para *J. curcas* varió 0.55 y 0.88) (Dhakshanamoorthy *et al.*, 2015), en *Morus* spp. el coeficiente de similitud varió de 0.29 a 0.90 para RAPD y de 0.36 a 0.81 para ISSR (Banerjee *et al.*, 2016). En 18 cultivares de *Rosa indica* la distancia genética varió de 0.40 a 0.91 para RAPD (Chakrabarty y Datta, 2010). El análisis del dendograma basado en UPGMA de los perfiles RAPD mostró dos grupos entre los mutantes (Figura 6). Se encontró una máxima similitud de 96% entre los mutantes de frutos con pericarpio de color rojo y que se diferencia del resto de los tratamientos. Resultados iguales de máxima similitud de 96% se observó en cuatro genotipos de *C. annuum* con RAPD (Rana *et al.*, 2014). El análisis RAPD puede utilizarse no sólo para estimar la diversidad genética en las especies, si no para la correcta identificación de nuevas variedades mutantes para su protección legal y derecho de variedad (Chakrabarty y Datta, 2010). El análisis PCoA demostró que los tratamientos con frutos de color negro y los frutos con pericarpio de color rojo estuvieron alejados de los tratamientos no irradiados (Figura 7). El análisis de

componentes principales (PCA) en *Curcuma alismatifolia* demostró que todas las plantas individuales irradiadas fueron fenotípicamente diferentes de los individuos no irradiados (Thaeri *et al.*, 2014). Los PCA ha servido para separar e identificar genotipos de arroz tolerantes a altas temperaturas (Pradhan *et al.*, 2016). Finalmente los marcadores RAPD, dendograma y PCoA son una herramienta confiable para demostrar las diferencias entre las plantas mutantes y las plantas control en la generación M<sub>2</sub> de chile chilhuacle. La información generada son datos valiosos para la caracterización de genes específicos de chile chilhuacle en futuras investigaciones.

#### 6.4. CONCLUSIÓN

La RG con 10 Gy y el PO de - 0.072 y - 0.092 MPa aportaron los valores más altos en las variables de rendimiento. En la generación M<sub>1</sub> se obtuvieron dos plantas cuyos frutos presentaron el pericarpio de color rojo, estos frutos fueron diferentes a los frutos de color rojo testigos y fué corroborado con el uso de marcadores RAPD. Las concentraciones de clorofilas se redujeron en todos los niveles de RG probados. Con 120 Gy, la concentración de aminoácidos en hojas se incrementó 29.08% respecto a los tratamientos sin irradiar. Sin embargo, con una menor concentración de sales la concentración de aminoácidos totales fue favorecida significativamente. La interacción de 80 Gy y - 0.036 MPa incrementó la concentración de aminoácidos en tejido foliar. La concentración de azúcares solubles totales en los frutos fue significativo con 80 y 120 Gy con incrementos de 20.23% y 20.25% respecto al tratamiento sin irradiar. En tanto que con un PO de - 0.036 MPa éstos se incrementaron (1988.5 µg g<sup>-1</sup>); cuando la interacción es de 80 Gy y - 0.108 MPa los azúcares se incrementan de forma significativa en los frutos (2366.97 µg g<sup>-1</sup>). Los sólidos solubles se incrementaron de manera significativa por RG y PO. Las hojas fueron los órganos donde la concentración de micronutrientos (Fe, Cu y Zn) fue mayor por efecto de la RG y PO que en tallo, ramas y frutos.

Este es el primer informe sobre la caracterización molecular de mutagénesis inducida mediante RG con el uso de los marcadores RAPD en la generación M<sub>2</sub> del chile chilhuacle. Nuestros datos sustentan que los marcadores RAPD son una metodología fiable para la detección de polimorfismos en el ADN de posibles mutantes obtenidas por RG, lo anterior también fue corroborado por

el PPB, Rp e MI, siendo los primer D-20 y C-05 con mayor información. La variación genética observada por los RAPD separó dos grupos de mutantes, en donde el primer grupo incluyó las plantas con frutos de color negro y el segundo grupo, plantas con frutos de color rojo.

### **Agradecimiento**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT-México), al Laboratorio de Nutrición Vegetal, al Programa de Innovación Agroalimentaria Sostenible del Colegios de Postgraduados, al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, por el apoyo y facilidades concedidas para esta investigación.

### **6.5. BIBLIOGRAFÍA CITADA**

- Agrawal, S. B. and D. Rathore.** 2007. Changes in oxidative stress defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) cultivars grown with and without mineral nutrients and irradiated by supplemental ultraviolet-B. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 21–33.
- Ahloowalia, B. S., M. Maluszynski, and K. Nichterlein.** 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135: 187-204.
- Ahmed, S. M.** 2013. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in the evaluation of genetic polymorphism of Egyptian *Capsicum* L. hybrids. *African Journal of Biotechnology*, 12: 655-669.
- Ahuja, S., M. Kumar, P. Kumar, V. K. Gupta, R. K. Singhal, A. Yadav, and B. Singh.** 2014. Metabolic and biochemical changes caused by gamma irradiation in plants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 300: 199-212.
- Alcántar, G. G. and V. M. Sandoval.** 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de Muestreo, Preparación, Análisis e Interpretación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo.

- Ali, H., Z. Ghorji, S. Sheikh, and A. Gul.** 2015. Effects of gamma radiation on crop production. In: *Crop Production and Global Environmental Issues*. Springer, p. 27–78.
- Alikamanoglu, S., O. Yaycili and A. Sen.** 2011. Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). *Biological Trace Element Research*, 141: 283-293.
- Al-Safadi, B. Z. Ayyoubi and D. Jawdat.** 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 183–187.
- Arisha, M. H., B. K. Liang, S. M. Shah, Z. H. Gong, and D. W. Li.** 2014. Kill curve analysis and response of first generation *Capsicum annuum* L. B12 cultivar to ethyl methane sulfonate. *Genetics and Molecular Research*, 13: 10049-10061.
- Arisha, M. H., S. N. Shah, Z. H. Gong, H. Jing, C. Li, and H. X. Zhang.** 2015. Ethyl methane sulfonate induced mutations in M<sub>2</sub> generation and physiological variations in M<sub>1</sub> generation of peppers (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Aslam, R., T. M. Bhat, S. Choudhary, M. Y. K. Ansari, and D. Shahwar.** 2016. Estimation of genetic variability, mutagenic effectiveness and efficiency in M<sub>2</sub> flower mutant lines of *Capsicum annuum* L. treated with caffeine and their analysis through RAPD markers. *Journal of King Saud University-Science*.
- Atak, C., S. Alikamanoğlu, L. Açıık and Y. Canbolat.** 2004. Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556: 35-44.
- Bahurupe, J. V., S. B. Sakhare, P. L. Kulwal, A. A. Akhare and B. D. Pawar.** 2013. Genetic diversity analysis in chilli (*Capsicum annuum* L.) using RAPD markers. *The Bioscan*, 8: 915–918.
- Baier, M., G. Hemmann, R. Holman, F. Corke, R. Card, C. Smith, F. Rook, M. W. Bevan.** 2004. Characterization of Mutants in *Arabidopsis* Showing Increased Sugar-Specific Gene Expression, Growth, and Developmental Responses. *Plant Physiology*, 134: 81–91.

- Banerjee, R., S. Chattopadhyay and A. K. Saha.** 2016. Genetic Diversity and Relationship of *Mulberry Genotypes* Revealed by RAPD and ISSR Markers. *Journal of Crop Improvement*, 30: 478–492.
- Bhadragoudar, M. R and C. G. Patil.** 2011. Assessment of genetic diversity among *Capsicum annuum* L. genotypes using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 10: 17477–17483.
- Bhat, R., K. R. Sridhar, C. C. Young, A. A. Bhagwath, and S. Ganesh.** 2008. Composition and functional properties of raw and electron beam-irradiated *Mucuna pruriens* seeds. *International journal of food science & technology*, 43: 1338-1351.
- Bremner, J. M.** 1965. Total nitrogen. In C. A. Black (ed.) *Methods of soil analysis*. Part 2 Chemical and microbiological properties, Madison, WI, USA: American Society of Agronomy Inc. Publisher, pp. 1149–1178.
- Castañeda-Álvarez, N. P., C. K. Khoury, H. A. Achicanoy, V. Bernau, H. Dempewolf, R. J. Eastwood, et al.** 2016. Global conservation priorities for crop wild relatives. *Nature Plants*, 2: 16022.
- Çelik, Ö. and Ç. Atak.** 2017. Applications of Ionizing Radiation in Mutation Breeding. In: *New Insights on Gamma Rays*. InTech.
- Chakrabarty, D. and S. K. Datta.** 2010. Application of RAPD markers for characterization of  $\gamma$ -ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity. *Plant Biotechnology Reports*, 4: 237–242.
- Chakravarty, B. and S. Sen.** 2001. Enhancement of Regeneration Potential and Variability by  $\gamma$ -Irradiation in Cultured Cells of *Scilla Indica*. *Biologia Plantarum*, 44: 189–93.
- Choudhary, K. K. and S. B. Agrawal.** 2014. Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 122–32.
- Clement, C. R., M. De Cristo-Araújo, G. Coppens D'Eeckenbrugge, A. Alves Pereira and D. Picanço-Rodrigues.** 2010. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity*, 2: 72–106.
- Cordoba, E., D. L. Aceves-Zamudio, A. F. Hernández-Bernal, M. Ramos-Vega and P. León.** 2014. Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER



PROTEIN 1 (STP1) expression in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 66: 147–159.

- Couée, I., C. Sulmon, G. Gouesbet and A. El Amrani.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 57: 449–459.
- De Micco, V., C. Arena, D. Pignalosa and M. Durante.** 2011. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. Radiation and Environmental Biophysics, 50: 1–19.
- Deng, Z., F. Goktepe, B. K. Harbaugh and J. Hu.** 2007. Assessment of genetic diversity and relationships among caladium cultivars and species using molecular markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 132: 219–229.
- Devi, A. S. and L. Mullainathan.** 2011. Physical and chemical mutagenesis for improvement of chilli (*Capsicum annuum* L.). World Applied Sciences Journal, 15108–113.
- Dhakshanamoorthy, D., R. Selvaraj and A. Chidambaram.** 2015. Utility of RAPD marker for genetic diversity analysis in gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS)-treated *Jatropha curcas* plants. Comptes Rendus Biologies, 338: 75–82.
- Dhillon, R. S., Saharan, R. P., M. Jattan, T. Rani, R. N. Sheokand, V. Dalal, et al.** 2014. Molecular characterization of induced mutagenesis through gamma radiation using RAPD markers in *Jatropha curcas* L. African Journal of Biotechnology, 13: 806–813.
- Falusi, O. A., O. A. Y. Daudu and J. A. T. da Silva.** 2012. Effect of exposure time of fast neutron irradiation on growth and yield parameters of *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*. African Journal of Plant Science, 6: 251–255.
- García-Gaytán, V., F. C. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, G. A. Baca-Castillo, S. García-Morales.** 2017. The Chilhuacle Chili (*Capsicum annuum* L.) in Mexico: Description of the Variety, Its Cultivation, and Uses. International Journal of Agronomy, 2017: 1–13.
- García-Gaytán, V., S. García-Morales, H. V. Silva-Rojas, L. I. Trejo-Téllez and F. C. Gómez-Merino.** 2016. First Report of Powdery Mildew in Chilhuacle

Chili (*Capsicum annuum*) Caused by *Leveillula taurica* in Southern Mexico. Plant Disease, 100: 2325–2325.

- Geiger, M., P. Walch-Liu, C. Engels, J. Harnecker, E-D. Schulze, F. Ludewig, U. Sonnewald, W-R. Scheible and M. Stitt.** 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. Plant, Cell & Environment, 21: 253–268.
- Gilbert, J. E., R. V. Lewis, M. J. Wilkinson and P. D. S. Caligari.** 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. Theoretical and Applied Genetics, 98: 1125-1131.
- Girija, M., and D. Dhanavel.** 2009. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, ethyl methane sulphonate and their combined treatments in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Global Journal of Molecular Sciences, 4: 68-75.
- Giuffrida, F., G. Graziani, V. Fogliano, D. Scuderi, D. Romano and C. Leonardi.** 2014. Effects of Nutrient and NaCl Salinity on Growth, Yield, Quality and Composition of Pepper Grown in Soilless Closed System. Journal of Plant Nutrition, 37: 1455–74.
- Hernández-Verdugo, S., R. Luna-Reyes, and K. Oyama.** 2001. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. Plant Systematics and Evolution, 226: 129-142.
- Hildebrandt, T. M., A. Nunes Nesi, W. L. Araújo and H. P. Braun.** 2015. Amino Acid Catabolism in Plants. Molecular Plant; 8: 1563–1579.
- Honda, I., K. Kikuchi, S. Matsuo, M. Fukuda, H. Saito, H. Ryuto, N. Fukunishi and T. Abe.** 2006. Heavy-ion-induced mutants in sweet pepper isolated by M<sub>1</sub> plant selection. Euphytica, 152: 61–66.
- Horn, L. N., H. M. Ghebrehiwot, and H. A. Shimelis.** 2016. Selection of Novel Cowpea Genotypes Derived through Gamma Irradiation. Frontiers in plant science, 7.
- Hussein, O. S., A. H. Hanafy Ahm, A. R. Ghalab and A. M. El-Hefny.** 2012. Some Active Ingredients, Total Protein and Amino Acids in Plants Produced

from Irradiated *Ambrosia maritima* Seeds Growing under Different Soil Salinity Levels. American Journal of Plant Physiology, 7: 70–83.

- Ibbi, H.** 2003. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. Scientia Horticulturae, 97: 211–218.
- Jabeen, N. and B. Mirza.** 2002. Ethyl methane sulfonate enhances genetic variability in *Capsicum annuum*. Asian Journal of Plant Sciences, 1: 425–428.
- Jabeen, N. and B. Mirza.** 2004. Ethyl methane sulfonate induces morphological mutations in *Capsicum annuum*. International Journal of Agriculture and Biology, 6: 340–345.
- Jan, S., T. Parween, R. Hameed, O. T. Siddiqi and Mahmooduzzafar.** 2013. Effects of pressuring gamma irradiation on the photosynthetic pigments, sugar content and carbon gain of *Cullen corylifolium* (L.) Medik. Chilean journal of agricultural research, 73: 345–350.
- Jo, Y. D., S. H. Kim, J-E. Hwang, Y-S. Kim, H. S. Kang, S. W. Kim, S. J. Kwon, J. Ryu, J. B. Kim and S. Y. Kang.** 2016. Construction of mutation populations by gamma-ray and carbon beam irradiation in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Horticulture, Environment, and Biotechnology, 57: 606-614.
- Kaplan, F. and C. L. Guy.** 2004.  $\beta$ -Amylase Induction and the Protective Role of Maltose during Temperature Shock. Plant Physiology, 135: 1674–84.
- Kausar, T., K. Akram and J. H. Kwon.** 2013. Comparative effects of irradiation, fumigation, and storage on the free amino acids and sugar contents of green, black and oolong teas. Radiation Physics and Chemistry, 86: 96–101.
- Khan, M. H. and S. D. Tyagi.** 2009. Studies on induction of chlorophyll mutations in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. Frontiers of Agriculture in China, 3: 253-258.
- Kim, D. Y., M. J. Hong, C. S. Park and Y. W. Seo.** 2015. The effects of chronic radiation of gamma ray on protein expression and oxidative stress in *Brachypodium distachyon*. International Journal Radiation Biology, 91: 407–19.
- Kim, J. H., B. Y. Chung, J. S. Kim and S. G. Wi.** 2005. Effects of in planta gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of

red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of Plant Biology*, 48: 47–56.

**Kim, J. H., M. H. Baek, B. Y. Chung, S. G. Wi, and J. S. Kim.** 2004. Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *Journal of Plant Biology*, 47: 314–321.

**Kim, K. H., and H. S. Yook.** 2009. Effect of gamma irradiation on quality of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward). *Radiation Physics and Chemistry*, 78: 414–421.

**Krasensky, J. and C. Jonak.** 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1593–608.

**Kumar, P., V. Sharma, R. S. Raje and B. Singh.** 2016. Low-dose gamma irradiation induces water activity, leaf  $K^+/Na^+$ , glycine betaine, antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation and protease activity to enhance salt tolerance in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Mill sp]. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 308: 965-980.

**Lee, J. H. and T. H. Han.** 2014. Selection of mutants obtained by gamma ray irradiation and analysis of genetic variation using RAPD markers in *Acorus calamus* L. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55: 207–212.

**Lu, G., X. Zhang, Y. Zou, Q. Zou, X. Xiang, and J. Cao.** 2007. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88: 319-327.

**Maclachlan, S. and S. Zalik.** 1963. Plastid structure, chlorophyll concentration, and free amino acid composition of a chlorophyll mutant of barley. *Canadian Journal of Botany*, 41: 1053-1062.

**Maity, J. P., S. Kar, A. Chakraborty, M. Sudershan and S. C. Santra.** 2010. Study on trace elements (using energy dispersive X-ray fluorescence technique) of edible seeds from *Cicer arietinum* L. plants developed from gamma irradiated seeds and variation of yielding capacity. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 283: 225–230.

- Martínez, P. F. and D. Roca.** 2011. Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo. Sustratos, Manejo del Clima, Automatización y Control en Sistemas de Cultivo sin Suelo, pp. 37–77.
- McDonald, H., M. L. Arpaia, F. Caporaso, D. Obenland, L. Were, C. Rakovski, and A. Prakash.** 2013. Effect of gamma irradiation treatment at phytosanitary dose levels on the quality of ‘Lane Late’ navel oranges. *Postharvest biology and technology*, 86: 91-99.
- Miranda, R. de S., E. Gomes-Filho, J. T. Prisco and J. C. Alvarez-Pizarro.** 2016. Ammonium improves tolerance to salinity stress in *Sorghum bicolor* plants. *Plant Growth Regulation*, 78: 121–31.
- Mittler, R.** 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11: 15–19.
- Mittler, R. and E. Blumwald.** 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 443–462.
- Moore, S, and W. H. Stein.** 1854. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 211: 907–913.
- Moussa, H.** 2011. Low dose of gamma irradiation enhanced drought tolerance in soybean. *Acta Agronomica Hungarica*, 59: 1–12.
- Moyer, M.** 2010. How much is left? *Scientific American*, 303: 74–81.
- Mucciarelli, M., D. Ferrazzini, and P. Belletti.** 2014. Genetic variability and population divergence in the rare *Fritillaria tubiformis* subsp. *moggridgei* Rix (*Liliaceae*) as revealed by RAPD analysis. *PLoS one*, 9: e101967.
- Mullainathan, L., A. Sridevi, S. Umavathi and S. Gandhi.** 2014. Genetic variation in mutants of chilli (*Capsicum annuum*) revealed by RAPD marker. *International Letters of Natural Sciences*, 2014; 6.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321–5.
- Navarro, J. M., C. Garrido, M. Carvajal, V. Martínez.** 2002. Yield and fruit quality of pepper plants under sulphate and chloride salinity. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77: 52–57.
- Navarro, J. M., C. Garrido, P. Flores and V. Martínez.** 2010. The effect of salinity on yield and fruit quality of pepper grown in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8: 142–150.

- Oladosu, Y., M. Y. Rafii, N. Abdullah, G. Hussin, A. Ramli, H. A. Rahim and M. Usman.** 2016. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30: 1-16.
- Oyama, K., S. Hernández-Verdugo, C. Sánchez, A. González-Rodríguez, P. Sánchez-Pena, J. A. Garzón-Tiznado and A. Casas.** 2006. Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 553-562.
- Paran I, Y. Borovsky, S. Nahon and O. Cohen.** 2007. The use of induced mutations to study shoot architecture in *Capsicum*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55: 125–31.
- Parry, M. A., P. J. Madgwick, C. Bayon, K. Tearall, A. Hernandez-Lopez, M. Baudo, and M. Labhili.** 2009. Mutation discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2817-2825.
- Patterson, J. H., E. Newbigin, M. Tester, A. Bacic, and U. Roessner.** 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60: 4089-4103.
- Peakall, R. and P. E. Smouse.** 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Perry, L., and K. V. Flannery.** 2007. Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 11905-11909.
- Piñero, M. C., M. Pérez-Jiménez, J. López-Marín, and F. M. del Amor.** 2016. Changes in the salinity tolerance of sweet pepper plants as affected by nitrogen form and high CO<sub>2</sub> concentration. *Journal of Plant Physiology*, 200: 18-27.
- Pradhan, S. K., S. R. Barik, A. Sahoo, S. Mohapatra, D. K. Nayak, Mahender A, J. Meher, A. Anandan and E. Pandit.** 2016. Population structure, genetic diversity and molecular marker-trait association analysis for high temperature stress tolerance in rice. *PloS one*, 11: e0160027.

- Pruthi, J.** 2003. Chemistry and quality control of *Capsicums* and *Capsicum* products. In: *Capsicum*. CRC Press; (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles).
- Qi, W., L. Zhang., H. Xu. L. Wang and Z. Jiao.** 2014. Physiological and molecular characterization of the enhanced salt tolerance induced by low-dose gamma irradiation in *Arabidopsis* seedlings. *Biochemical and biophysical research communications*, 450: 1010–1015.
- Rana, M., R. Sharma, P. Sharma, S. V. Bhardwaj and M. Sharma.** 2014. Estimation of genetic diversity in *Capsicum annuum* L. germplasm using PCR-based molecular markers. *National Academy Science Letters*, 37: 295–301.
- Riek, J. D., E. Calsyn, I. Everaert, E. V. Bockstaele, and M. D. Loose.** 2001. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1254–65.
- Rohlf, F. J.** 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2. Exeter Software. Setauket, New York. - References - Scientific Research Publish.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. V. Bockstaele, A. Depicker, and M. D. Loose.** 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6: 125–34.
- Rolland, F., E. Baena-Gonzalez and J. Sheen.** 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review Plant Biology*, 57: 675–709.
- Rosa, M., C. Prado, G. Podazza, R. Interdonato, J. A. González, M. Hilal, and F. E. Prado.** 2009. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant signaling and Behavior*, 4: 388-393.
- Roychowdhury, R. and J. Tah.** 2013. Mutagenesis—A Potential Approach for Crop Improvement. In: Hakeem KR, Ahmad P, Ozturk M, editors. *Crop Improvement*. Springer US, p. 149–87.
- Samah, S., C. V. D. T. Pardo, M. A. S. Cruz, and E. Valadez-Moctezuma.** 2016. Genetic Diversity, Genotype Discrimination, and Population Structure of

Mexican *Opuntia* sp., Determined by SSR Markers. Plant Molecular Biology Reported, 34: 146–59.

- Sangsiri, C., W. Sorajjapinun and P. Srinives.** 2005. Gamma radiation induced mutations in mungbean. *Sci. Asia*, 31: 251–255.
- Schmidt, W.** 2003. Iron Homeostasis in Plants: Sensing and Signaling Pathways. *Journal of Plant Nutrition*, 26: 2211–2230.
- Sea, S., C. Rakovski, and A. Prakash.** 2015. Ripening Quality of “Bartlett” Pears (*Pyrus communis* L.) Subjected to Phytosanitary X-ray Irradiation Treatment Followed by Simulated Retail Display. *HortScience*, 50: 279–287.
- Singh, B. and P. S. Datta.** 2010. Effect of low dose gamma irradiation on plant and grain nutrition of wheat. *Radiation Physics and Chemistry*, 79: 819–825.
- Singh, B., S. Ahuja, R. K. Singhal and P. V. Babu.** 2013. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 298: 249–257.
- Southgate, D. A.** 1969. Determination of carbohydrates in foods. I. Available carbohydrate. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 20: 326–30.
- Steiner, A. A.** 1984. The universal nutrient solution. In: 6 International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands), ISOSC.
- Tadesse, T., M. A. Nichols and K. J. Fisher.** 1999. Nutrient conductivity effects on sweet pepper plants grown using a nutrient film technique. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 27: 229–37.
- Taheri, S., T. L. Abdullah, Z. Ahmad and N. A. P. Abdullah.** 2014. Effect of acute gamma irradiation on *Curcuma alismatifolia* varieties and detection of DNA polymorphism through SSR Marker. *BioMed research international*, p. 1-18.
- Trejo-Téllez, L. I. and F. C. Gómez-Merino.** 2012. Nutrient solutions for hydroponic systems. In: *Hydroponics-A Standard Methodology for Plant Biological Researches*. InTech.
- Tuteja, N. and S. K. Sopory.** 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signal & Behavior*, 3: 525–536.
- Valadez-Moctezuma, E. S. Samah and A. Luna-Paez.** 2015. Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant Systematics and Evolution*, 301: 737–47.



- Wall, M. M.** 2015. Phytosanitary irradiation and fresh fruit quality: cultivar and maturity effects. *Stewart Postharvest Review*, 11: 1–6.
- Wang, D. and P. W. Bosland.** 2006. The Genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41: 1169–87.
- Warncke, D. D.** 1985. Analyzing greenhouse growth media by the saturation extraction method. *HortScience*, 21: 223–225
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. H. Kim, M. H. Baek, D. H. Yang, J. W. Lee and J. S. Kim.** 2005. Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis* stems after gamma irradiation. *Journal of Plant Biology*, 48: 195–20